

**Mechanismen protektiver und destruktiver
Funktionen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
(PARP-1)
bei Zell- und Gewebeschädigungen**

HABILITATIONSSCHRIFT

ZUR ERLANGUNG DER LEHRBEFÄHIGUNG
FÜR DAS FACHANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich
geboren am 09. Juli 1970 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer.nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: Prof. Dr. med. K. Unsicker

Prof. Dr. med. K. Zilles

eingereicht am: 25. Januar 2002

Datum der Habilitation: 01. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	DIE POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG - BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN.....	4
1.1.1	Historische Aspekte.....	4
1.1.2	Enzyme und Gene des Poly(ADP-Ribose)-Stoffwechsels	5
1.2	ZELLULÄRE UND MOLEKULARE FUNKTIONEN DER POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG 10	
1.2.1	DNA-Reparatur und genomische Stabilität.....	11
1.2.2	Transkriptionskontrolle	13
1.2.3	Alterungsprozesse.....	13
1.2.4	Apoptose.....	14
1.3	DIE ROLLE DER POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG BEI DER TUMORTHERAPIE	16
1.4	DIE ROLLE DER POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG BEI ERKRANKUNGEN DES ZNS ...	19
1.4.1	Ischämie-Reperfusionsschäden	20
1.4.2	Die Rolle der Mikroglia nach primärer neuronaler Schädigung	22
1.4.3	Die Bedeutung der PARP bei der inflammatorische Sekundärschädigung	25
2	ERGEBNISSE.....	27
2.1	REGULATION DES NUKLEÄREN PROTEASOMS DURCH DIE POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE.....	27
2.1.1	Verstärkter proteasomaler Abbau geschädigter Proteine bei oxidativen Stress durch die Poly(ADP-Ribose-Polymerase)	27
	O. ULLRICH ET AL. FREE RADIC. BIOL MED. 31, 887-8983 (2001)	
	O. ULLRICH ET AL. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 362, 211-216 (1999)	
	O. ULLRICH ET AL. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 96, 6223-6228 (1999)	
2.1.2	Molekulare Grundlagen der Proteasomaktivierung durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase.....	34
	P. MEYER-KUCKUK AND O.ULLRICH ET AL. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMS. 259, 576-581 (1999)	
2.1.3	Endogene Inhibitoren der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase.....	35
	O. ULLRICH ET AL. BIOCHEM. J. 315, 705-708 (1996)	
	O. ULLRICH ET AL. FREE RADIC. BIOL. MED. 22, 1153-1157 (1997)	

2.2	MECHANISMEN DER ANTIOXIDATIVEN PROTEKTION VON TUMORZELLEN DURCH DIE POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE.....	37
2.2.1	Differenzierungsabhängige Regulation der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase.	37
	O. ULLRICH ET AL. FREE RADIC. BIOL. MED. 29, 995-1004 (2000)	
2.2.2	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-vermittelte Chemotherapie-Resistenz	39
	Ö. CIFTCI AND O. ULLRICH ET AL. BLOOD 97, 2830-2838 (2001)	
2.3	PROTEKTIVE FUNKTIONEN DER POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE IN AKTIVIERTEN MIKROGLIAZELLEN	43
	O. ULLRICH AT AL. FASEB J. 15, 1460-1462 (2001)	
2.4	DIE FUNKTION DER MIKROGLIALEN POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE IN EXZITOTOXISCH GESCHÄDIGTEM LEBENDEN HIRNGEWEBE	46
	O. ULLRICH ET AL. NATURE CELL BIOL. 3, 1035-1042 (2001)	
3	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	56
4	ZUSAMMENFASSUNG	60
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	63
6.	DANKSAGUNG.....	87
7	ANHANG.....	89
7.1	LEBENS LAUF.....	89
7.2	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	91
7.3	STIPENDIEN UND PREISE	100
7.4	LEHRE	101
7.5	DRITTMITTEL.....	103
7.6	WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG.....	104
7.7	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	106

1 Einleitung

1.1 Die Poly(ADP-ribosyl)ierung - Biochemische und zellbiologische Grundlagen

1.1.1 Historische Aspekte

Die Existenz von Poly(ADP-Ribose)-Molekülen im Kern von Säugerzellen als eine bis dahin noch unbekannte "dritte Art von Nukleinsäuren" (D'Amours et al., 1999) wurde vor etwa 40 Jahren erstmals 1963 von Chambon et al. beschrieben (Chambon et al., 1963). Dieses unbekannte Molekül wurde ursprünglich als ein Homopolymer aus Riboadenylat-Einheiten (Poly-A) angesehen (Chambon et al., 1963), 3 Jahre später aber von den gleichen Autoren nun richtigerweise als ein Homopolymer aus ADP-Ribose-Einheiten beschrieben, bei dessen Synthese die Hydrolyse von NAD^+ und die Freisetzung von Nikotinamid beobachtet wurde (Chambon et al., 1966; Chambon et al., 1963). Im Zuge der Fokussierung der biowissenschaftlichen Forschung auf die Nukleinsäuren DNA und RNA vergingen anschließend mehr als 10 Jahre bis zur vollständigen Aufklärung der Struktur dieser "dritten Nukleinsäure", die sich als hochverzweigtes Molekül mit einer helicalen Struktur in den linearen Abschnitten erwies (Miwa et al., 1981; Minaga et al., 1983).

Über mögliche zellbiologischen Funktionen gab es damals so gut wie keine Erkenntnisse, und die Arbeit an dem Phänomen "Poly(ADP-Ribosyl)ierung" galt noch bis zum Beginn der 90-er Jahre als ein eher "esoterisches" Gebiet, auf dem nur eine sehr begrenzte Zahl von Forschergruppen tätig war (Bürkle et al., 2001). Diese Situation hat sich den letzten 10 Jahren dramatisch geändert, nicht nur mit dem deutlichen Zuwachs an Erkenntnissen über die biochemischen Aspekte der Poly(ADP-ribosyl)ierung wie z.B. die Identifizierung wichtiger Zellkernproteine, deren Funktionen Poly(ADP-ribosyl)ierungs-abhängig reguliert werden, sondern auch vor allem mit der Erkenntnis ihrer Beteiligung an der DNA-Reparatur, an der Apoptose und an der Transkriptionsregulation (Bürkle et al., 2001; D'Amours et al., 1999). Hinzu kamen wesentliche neue Erkenntnisse über die zentrale Rolle der Poly(ADP-Ribosyl)ierung im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsschäden im ZNS, bei neurodegenerativen Erkrankungen (Ha et al., 2000) und bei inflammatorischen Gewebeschäden wie z.B. beim juvenilen Diabetes mellitus (Burkart et al., 1999; Pieper et al., 1999), beim

septischen Schock (Szabo et al., 1996; Szabo et al., 1997; Oliver et al., 1999), beim M.Crohn (Jijon et al., 2000) und beim Myokardinfarkt (Pieper et al., 2000; Zingarelli et al., 1998). Neben den Erkrankungen des ZNS wird der Poly(ADP-Ribosyl)ierung aufgrund ihrer Funktion bei der DNA-Reparatur auch eine wesentliche Bedeutung im Rahmen der Abwehrmaßnahmen von Tumorzellen bei der chemo- oder radiotherapeutischen Tumorbehandlung zugesprochen (de Murcia et al., 2000).

Seit Mitte und Ende der 90-er Jahre haben daher eine Vielzahl pharmazeutischer Unternehmen mit der präklinischen Entwicklung von selektiven Inhibitoren der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) begonnen, deren Haupteinsatzgebiet die Therapie des Schlaganfalls und die Behandlung von Tumorerkrankungen sein soll (z.B. Guilford Inc. und Agouron/Pfizer Inc.). Eine ganz neue Dimension erhielt die Erforschung der Poly(ADP-ribosyl)ierung mit der Entdeckung einer Vielzahl "neuer" PARPs ab dem Jahr 1998, deren Funktion und Lokalisation sich teilweise grundsätzlich von der "klassischen" PARP, nun PARP-1 genannt, unterscheidet: Diese neuen PARPs sind z.B. an der Regulation der Telomersynthese (Tankryase, Smith et al., 1998) oder der Funktion der mitotischen Spindel (VPARP, Kieckhoefer et al., 1999) essentiell beteiligt.

Die in dieser Schrift zusammengefaßten Arbeit sollten durch die Entdeckung von zwei grundsätzlich neuen zellbiologischen Funktionen der PARP-1 und der Identifizierung und Charakterisierung dieser neuen Funktionen unter pathophysiologischen Bedingungen zu einem erweiterten molekularen und funktionellen Verständnis der Poly(ADP-ribosyl)ierung bei Zell- und Gewebeschädigungen beitragen. Diese hier vorgelegten Arbeiten haben bereits Eingang in kürzlich erschienene Übersichtsarbeiten (Bürkle et al., 2001) gefunden und wurden im Zusammenhang mit der im Juni 2001 stattgefundenen "18th Conference on ADP-ribosylation reactions" in New York als eine der fünf wichtigsten Fortschritte der PARP-Forschung der letzten 5 Jahre genannt (Jacobson et al., 2001).

1.1.2 Enzyme und Gene des Poly(ADP-Ribose)-Stoffwechsels

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine direkte posttranslationale Modifikation von Glutamat-, Aspartat- und Lysin-Resten nukleärer Proteine (Akzeptorproteine), die durch ein 113 kDa-großes Enzym, die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1; EC 2.4.2.30), katalysiert wird. Diese ADP-Ribose-Polymere entstehen aus der sequentiellen

Synthese von ADP-Ribose-Einheiten aus NAD^+ und können eine sehr hohe Komplexität erreichen, mit bis zu 200 Einheiten und verschiedenen Verzweigungsstellen. Diese Polymere repräsentieren nun eine geballte Ansammlung negativer Ladungen, die entscheidend für die physiologische Funktion der Poly(ADP-Ribose) sind (de Murcia et al., 2000; Realini et al., 1992).

Ohne den später behandelten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der PARP vorzugreifen, soll zum Verständnis der Biochemie dieser Reaktion bereits hier erwähnt werden, welche dramatischen Auswirkungen diese auf den Zellstoffwechsel haben kann: Im Zellkern von Säugerzellen lauert etwa ein PARP-1-Molekül pro 1000 DNA-Basenpaare (Lautier et al., 1993), das sind etwa eine Million PARP-1-Moleküle pro Zelle (Ludwig et al., 1988), bereits nach geringsten DNA-Schäden sofort hochaffin an die DNA zu binden (Zhang et al., 1995) und unter einer etwa 500-fachen Aktivitätssteigerung innerhalb von Minuten (Krupitza et al., 1989) gewaltige Mengen an ADP-Ribose-Polymeren zu synthetisieren. Dabei kann es innerhalb von wenigen Minuten zur Hydrolyse von über 80 % des gesamten zellulären NAD^+ -Pools kommen, worauf die Zelle den durch ATP-Mangel verursachten nekrotischen Tod stirbt (Berger et al., 1985; Ha et al., 2000; Bürkle et al., 2001).

Natürlich markiert dieses Szenario nur das extreme Ende auf einer Skala abgestufter und fein regulierter Poly(ADP-ribosy)ierungs-Reaktionen im Rahmen der physiologischen Zellfunktion, macht aber deutlich, daß die Frage der Balance zwischen physiologischer und destruktiver Funktion der PARP eher ein rein quantitative als ein qualitative Frage ist (Bürkle et al., 2001).

Die PARP-1 ist das bisher am besten untersuchte Protein der PARP-Protein-Familie. Sie ist ein evolutionär hochkonserviertes Enzym mit einer charakteristischen 3-Domänen-Struktur: Die 42 kDa große aminoternale Region bindet über zwei Zink-Finger-Motive an DNA-Strangbrüche, die zu einer sofortigen Aktivierung des katalytischen Zentrums der carboxyterminalen NAD^+ -bindenden Domäne führt. Die katalytisch aktive Form der PARP-1 ist ein Dimer (Mendoza-Alvares, 1993). Das wichtigste Akzeptorprotein für die ADP-Ribose-Polymere ist dabei die PARP-1 selbst, wobei diese Automodifikation hauptsächlich an einer 16 kDa-großen separaten Protein-Domäne stattfindet, die 15 konservierte Glutamat-Seitenketten als Akzeptorstellen für die Poly(ADP-Ribose) besitzt (D'Amours et al., 1999). Eine weitere, Strangbruch-unabhängige, aber sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität der PARP-1 wird den

Modulen C und D zugesprochen, die somit wahrscheinlich eine Rolle in der Transkriptionsregulation spielen (D'Amours et al., 1999).

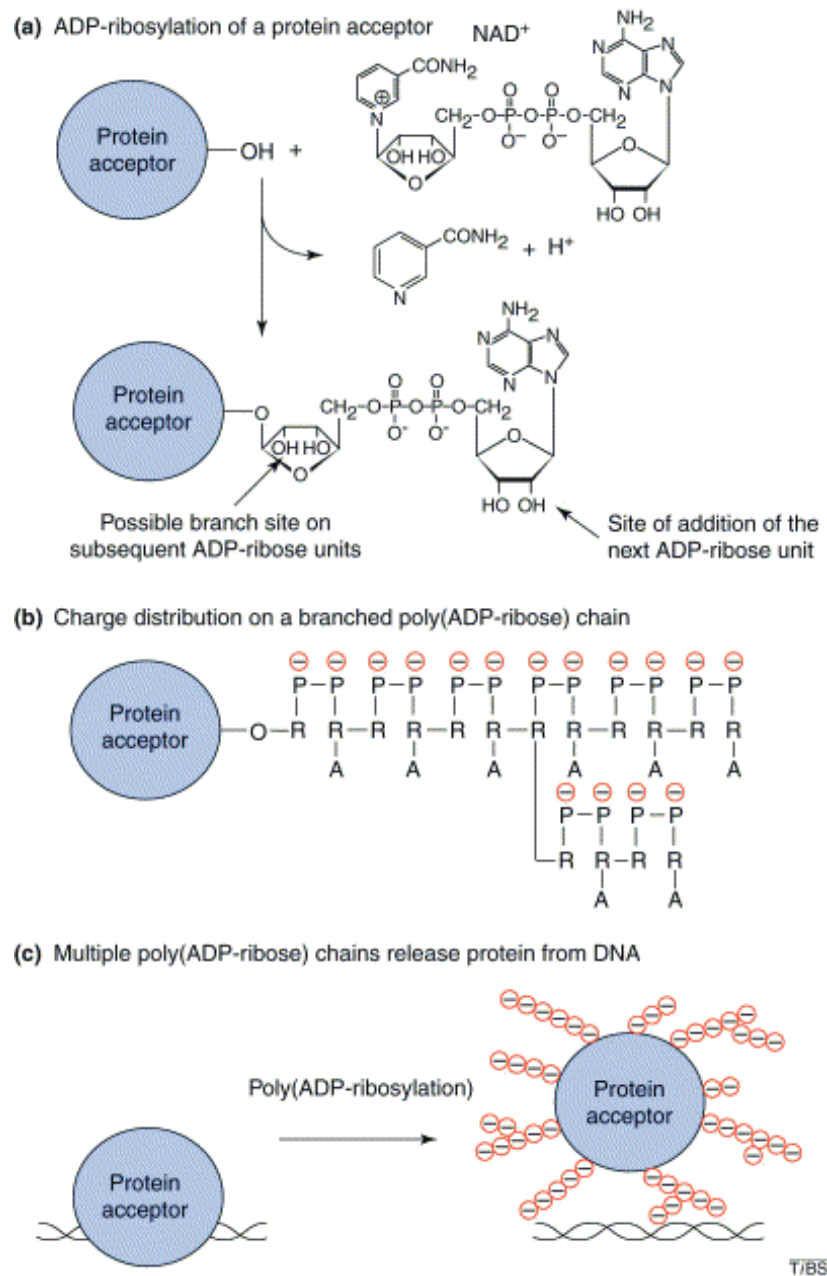


Abb. 1: (aus Smith S. **The world according to PARP. Trends in Biochemical Sciences** 26, 174-179, 2001): (a) ADP-Ribosylierung eines Akzeptor-Proteins: Übertragung von ADP-Ribose aus NAD^+ auf einen Glutamat-Rest an einem Akzeptor-Protein durch die PARP. Die an das Protein gebundene ADP-Ribose-Einheit kann nun als Akzeptor für weitere ADP-Ribose-Einheiten dienen. (b) Synthese des hochgradig negativ geladenen langen, linearen und verzweigten ADP-Ribose-Polymers. (c) Viele kovalent gebundene hochgradig negativ geladene ADP-Ribose-Polymere lösen das so modifizierte Protein von der DNA ab.

Die PARP-1 wird vom humanen *ADPRT*-Gen (chromosomale Lokalisation 1q41-q42) codiert, das analoge murine *Adprt1*-Gen codiert zusätzlich noch für das murine 55kDa große sPARP-1-Protein (Sallmann et al., 2000). Experimente an Ewing's-Sarkom-Zellen haben Hinweise darauf geliefert, daß die *ADPRT*-Expression durch einen ETS-Transkriptionsfaktor reguliert wird, der mit multiplen ETS-Bindungs-Motiven der *ADPRT*-Promoter-Region interagiert (Soldatenkov et al., 1999). Während das *ADPRT*-Gen konstitutionell abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsgrad exprimiert wird, kann die katalytische Aktivität der PARP-1 durch Bindung an DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche bis auf das 500-fache gesteigert werden (Krupitza et al., 1989). Diese Aktivierung findet unmittelbar nach einem DNA-Schaden statt und kann bereits bei sehr wenigen DNA-Schäden nachgewiesen werden (Zhang et al., 1995).

Seit wenigen Jahren ist bekannt, daß die "klassische" PARP, die heutige "PARP-1" nicht das einzige Enzym mit Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität ist. So wurden kürzlich weitere Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen identifiziert (Smith et al., 2001), die bis zu 25% der gesamten zellulären Poly(ADP-Ribose)-Produktion ausmachen (Shieh et al., 1998). Zu diesen neu entdeckten Proteinen aus der PARP-Familie gehören die humane hPARP-2, die humane hPARP-3, die murine mPARP-2 und die murine sPARP (Ame et al., 1999; Berghammer et al., 1999; Johansson et al., 1999; Sallmann et al., 2000). Auch die bisher verbreitete Ansicht, daß PARPs nur auf den Säugerorganismus beschränkt sind, konnte widerlegt werden: Zwar konnten bisher weder in Hefen, noch in Bakterien PARPs nachgewiesen werden, wohl aber in Pflanzen. So besitzen *Arabidopsis thaliana* (Babiyshuk et al., 1998) und *Zea mays* (Mahajan et al., 1998) eine PARP ohne aminoterminalen Zink-Finger-Domäne. Auch in *Drosophila* konnte eine PARP mit (dPARP-1) und eine PARP ohne (dPARP-2) Automodifikationsdomäne nachgewiesen werden (Kawamura et al., 1998).

Während die carboxyterminale katalytische Domäne der 62 kDa großen mPARP-2 homolog zur PARP-1 ist, fehlen der aminoterminalen Domäne die beiden Zink-Finger-Motive und die Kernlokalisationssequenz. Trotzdem zeigt auch die mPARP-2 eine DNA-abhängige Aktivität (Ame et al., 1999). Der 55,3 kDa großen sPARP-1 fehlen die aminoterminalen und zentrale Proteindomäne, während die carboxyterminale katalytische Domäne zur PARP-1 identisch ist. Im Gegensatz zur PARP-1 und mPARP-2 kann aber die sPARP DNA-unabhängig aktiviert werden, aber

auch durch DNA-Strangbrüche (Sallmann et al., 2000). Die mPARP-2 ist weit weniger katalytisch aktiv als die PARP-1, kann aber wahrscheinlich zu einem großen Teil zur Gesamt-PARP-Aktivität der Zelle beitragen. Wie die PARP-1, kommen auch die hPARP-2, mPARP-2 und hPARP-3 praktisch ubiquitär vor. Alle diese PARPs werden von grundsätzlich verschiedenen Genen mit Lage auf verschiedenen Chromosomen codiert, mit Ausnahme der sPARP-1, deren Gen unmittelbar in der Nähe zu dem der PARP-1 liegt (Ame et al., 1999). Das legt die Vermutung nahe, daß die sPARP-1 ein Produkt einer alternativen Initiationsstelle der Transkription des PARP-Gens darstellt.

Ein weiteres interessantes Protein aus der PARP-Familie ist die 1998 entdeckte Tankryase (Smith et al., 1998). Diese 142 kDa große PARP interagiert über 24 ankryin-repeat-Motive mit der aminoterminalen Domänen von TRF1, einem Telomer-spezifischen Protein, das die Polymerlänge reguliert (Smith et al., 1998). Der Name leitet sich von "TRF1-interacting, ankryin-related ADP-ribose polymerase" = "Tankryase" (Smith et al., 1998) her. Durch die Bindung an TRF-1 verhindert die Tankryase dessen Bindung an die Telomere, was die Telomer-Elongation begünstigt, vermutlich über eine Eröffnung des Telomer-Komplexes und Ermöglichung des Zuganges der Telomerase (Smith et al., 2000). Ein weiteres Protein aus der Familie der PARPs stellt die 1999 entdeckte 93 kDa große Vault-Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (VPARP) dar, die das "major vault protein" (MVP) ADP-ribosyliert und in der Mitosespindel lokalisiert ist (Kieckhoefer et al., 1999).

Die Vielzahl neu entdeckter Proteine aus der PARP-Familie legen nahe, daß die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ein innerhalb der Zelle durchaus sehr verbreitetes Regulationsprinzip sein könnte, das nicht allein auf den Zellkern beschränkt ist. Die Schnelligkeit dieser Reaktion innerhalb von Minuten nach einem auslösenden Ereignis, die gravierenden Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften eines so modifizierten Proteins durch das Einführen einer gewaltigen Zahl negativer Ionenladungen und die Existenz DNA-unabhängiger PARPs lassen vermuten, daß die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wahrscheinlich in noch vielfältigerer Weise an der intrazellulären Signaltransduktion teilnimmt, als bisher vermutet. Unabhängig davon trägt die rein nukleär lokalisierte PARP-1 zu über 80 % der Poly(ADP-Ribosyl)ierungskapazität einer Zelle bei und ist hier Gegenstand der Untersuchungen.

Nach der Betrachtung der Poly(ADP-Ribose)-Synthese soll hier auch der enzymatische Abbau der Poly(ADP-Ribose) nicht unerwähnt bleiben: Poly(ADP-Ribose) hat eine sehr

kurze Halbwertszeit von etwa 1 min (Alvarez-Gonzales et al., 1989) und wird durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) zu freier ADP-Ribose abgebaut (Miwa et al., 1971). Diese PARG ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert und in etwa 13-50-mal geringerer Konzentration vorhanden als die PARP, ist dafür aber etwa 50-70-mal katalytisch aktiver und dadurch in der Lage, Poly(ADP-Ribose) ohne kinetische Limitierung abzubauen (Hatakeyama et al., 1986). Über die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen des dabei entstehenden Produktes, der freien ADP-Ribose, ist bisher nur wenig bekannt. Diese freie ADP-Ribose ist in der Lage, sehr schnell über die Maillard-Reaktion mit Lysin-Seitenketten von Proteinen zu reagieren und diese nichtenzymatisch zu glykosylieren (Cervantes-Laurean et al., 1996). Die Reaktion von Histon H1 mit freier ADP-Ribose führt zur dessen Carbonylierung (Wondrak et al., 2000). Derzeit vorherrschende Ansichten favorisieren allerdings die Abspaltung der ADP-Ribose-Polymere vom Akzeptorprotein durch eine ADP-Ribosyl-Protein-Lyase, wonach eine ADP-Ribose-Pyrophosphatase die freien ADP-Ribose-Monomere zu AMP und Ribose-5-Phosphat abbaut (Wielckens et al., 1982).

1.2 Zelluläre und molekulare Funktionen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Grundlage der zellulären und molekularen Funktionen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist entweder die direkte kovalente Modifikation von Aminosäureseitenketten von Akzeptorproteinen durch Synthese polymerer ADP-Ribose-Ketten (Heteromodifikation), oder die nichtkovalente Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten der automodifizierten PARP-1 an Effektorproteine (de Murcia et al., 2000; Pleschke et al., 2000). Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen führt zur Chromatindekondensation (Frechette et al., 1985, Niedergang et al., 1985), die eine Voraussetzung für die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA darstellt. Nach Abbau der Poly(ADP-Ribose) kommt es wieder zur Kondensation des Chromatins (de Murcia et al., 1986). Die sofortige und schnelle Bindung der PARP-1 an DNA-Schäden verhindert hocheffektiv die Interaktion geschädigter DNA mit genetischen Rekombinationssystemen und die Bindung anderer DNA-bindender Moleküle (Chatterjee et al., 1999; de Murcia et al., 1997; Morrison et al., 1997; Wang et al., 1997). Dadurch kann ein sofortiger Stop der Translation durch Bindung an Stellen der Transkriptionsinitiation ("nick-protection") erreicht werden, so daß eine fehlerhafte Translation vermieden wird. Nach Abdiffusion der PARP-1 unter Mitnahme von nicht-

kovalent-gebundenen Histonen wird dann die DNA ihren Reparaturenzymen zugänglich gemacht (de Murcia et al., 1994). Dieses "Histon-Shuttling" und die "Nick-Protection" sind wichtige Erklärungsmodelle der Funktion der PARP-1 bei DNA-Reparatur und Erhaltung der genomischen Stabilität:

1.2.1 DNA-Reparatur und genomische Stabilität

Schon seit 1985 ist bekannt, daß die Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen über die Aktivierung der PARP zu einer deutlichen NAD^+ -Depletion führt (Berger et al., 1985). Daher können entsprechend massive DNA-Schäden über eine Überaktivierung der PARP, zum schnellen und drastischen Verlust an NAD^+ und ATP zum Zelltod führen (Berger et al., 1985). Dieses Konzept stellt etwa 10 Jahre später die Grundlage späterer Experimente zum neuronalen Zelltod nach einem Ischämieschaden und seiner Verhinderung durch Hemmung der der PARP-1 dar (Zhang et al., 1994; Cusi et al., 1994; Eliasson et al., 1997).

Es gilt als sicher, daß die Poly(ADP-Ribosyl)ierung das Überleben von proliferierenden Zellen ermöglicht, die auf einem moderaten Niveau mit DNA-schädigenden Substanzen wie Alkylantien, Oxidantien und ionisierender Strahlung ausgesetzt worden sind (de Murcia et al., 2000). Ebenso gilt eine Beteiligung der PARP-1 bei der DNA-Basen-Exzisionsreparatur, dem bevorzugten Weg, DNA-Schäden geringer Größe zu entfernen, als sicher (de Murcia et al., 2000). Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung repräsentiert hier eine sofortige zelluläre Antwort auf DNA-Schäden, induziert durch ionisierende Bestrahlung, alkylierende Agentien und Oxidantien (de Murcia et al., 2000). Die molekulare Funktion der PARP-1 bei der nukleären Reaktion auf DNA-Schäden liegt dabei wahrscheinlich in der nicht-kovalenten Bindung der Poly(ADP-Ribose) an spezifische Checkpoint-Proteine des DNA-Schadens über eine 20 Aminosäuren lange Poly(ADP-Ribose)-Bindungssequenz begründet: So wurde eine Bindung der automodifizierten PARP an folgende Checkpoint-Proteine nachgewiesen: p53, p21^{CIP1/WAF1}, XPA, MSH6, DNA-Ligase III; XRCC1, DNA-Polymerase ϵ , DNA-PK CS , Ku70, NF- κ B, iNOS, Caspase-aktivierte DNase und Telomerase (Pleschke et al., 2000).

Auf den ersten Blick erscheint es nun widersprüchlich, daß die PARP-1 über "nick-protection", das "histon-shuttling" und die Bindung an Checkpoint-Proteine des DNA-Schadens die DNA-Reparatur einleitet, auf der anderen Seite aber ebenfalls nach einem

DNA-Schaden über die NAD^+ - und ATP-Depletion die Zelle metabolisch zu töten vermag. Doch dieses ist nur scheinbar ein Widerspruch, denn genomisch schwer geschädigte Zellen zeigen eine erhöhte Mutationsrate und eine höhere Wahrscheinlichkeit zur malignen Transformation. Die Aktivierung der PARP nach einem DNA-Schaden führt dann für die individuelle Zelle zu einer schicksalshaften Entscheidung, entweder zur Reparatur des Schadens oder zum Tod der schwer genomisch geschädigten Zelle. Für den Gesamtorganismus hat diese extreme Dichotomie auf Zellebene, Reparatur oder Tod, allerdings nur eine Konsequenz: Das Vermeiden der Entstehung genomisch geschädigter Zellpopulationen.

Die Bedeutung der PARP-1 für die genomische Stabilität konnte auch in in vivo-Experimenten gezeigt werden: So zeigte die PARP-1^{-/-} - Maus schwere Hämorrhagien nach ionisierender Bestrahlung aufgrund einer schweren Myelosuppression (Masutani et al., 2000) und eine hohe Anfälligkeit gegenüber alkylierenden Substanzen (Tsutsumi et al., 2001). Interessanterweise wird diese genomische Stabilität vermutlich nicht allein über die aktivierte PARP, sondern auch über das „inaktive“ PARP-Protein selber erreicht: So konnte die genomisch instabile tetraploide Zellpopulation in PARP-1^{-/-} - Fibroblasten durch Transfektion mit einer PARP-1-cDNA in eine stabile Form überführt werden, während PARP-1^{+/+} - Fibroblasten durch Hemmung der PARP-1 aber nicht in eine tetraploide Form überführt werden konnten (Simbulan-Rosenthal et al., 2001). Diese Effekte der PARP-1 sind möglicherweise teilweise unabhängig von ihrer katalytischen Funktion, z.B. als Co-Transaktivator von NF- κ B (Oliver et al., 1999). In einem umgekehrten Ansatz verhinderte die Überexpression der PARP-1 deutlich den Alkylantien-induzierten sister-chromatid-exchange (SCE) bei gleichzeitigem Anstieg der Zytotoxizität (Meyer et al., 2000). Das Konzept "Reparatur oder Tod" im Falle von DNA-Schäden auf Einzelzellebene scheint hierbei für physiologische Bedingungen durchaus sinnvoll zu sein. Aber im Falle einer "unphysiologischen" und vorsätzlichen Zellschädigung, wie z.B. im Rahmen der Tumorthherapie, kann der Eingriff in die Poly(ADP-Ribosyl)ierung prinzipiell zwei gegensätzliche Konsequenzen haben: Entweder den verstärkten Tumorzelltod durch Hemmung der Reparaturprozesse oder ein verbessertes Tumorzellüberleben durch Hemmung der todbringenden PARP-1-induzierten NAD^+ - und ATP-Depletion. Das gleichzeitige Existieren beider gegensätzlicher Möglichkeiten dürfte die Anwendung von PARP-1-Inhibitoren in der Tumorthherapie prinzipiell erschweren.

1.2.2 Transkriptionskontrolle

In den letzten Jahren wurden viele funktionelle Interaktionen zwischen der automodifizierten PARP-1 mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren gefunden (de Murcia et al., 2000): AP-2, DF1-4, E47, NF- κ B, 53, PC1, Oct-1, RXR, TBP, TEF-1 und YY1. Diese Interaktion mit der automodifizierten PARP-1 hatte dabei entweder positive oder negative Effekte auf den Transaktivationsprozeß. Umfangreiche Mikroarray-Analysen zur Charakterisierung der Genexpression in PARP-1^{-/-} - Mäusen erbrachten eine verminderte Expression von Genen der Zellzyklus-Progression, der Mitose, der DNA-Replikation und der Chromosomen-Prozessierung und -Assemblierung (Simbulan-Rosenthal et al., 2000). Demgegenüber wurden Gene, die vermutlich in die Kanzerogenese oder vorzeitiges Altern involviert sind, verstärkt exprimiert (Simbulan-Rosenthal et al., 2000).

Darüberhinaus wurde die PARP-1 auch als ein Ko-Faktor der NF- κ B-gesteuerten Transaktivierung identifiziert, die eine zentrale Rolle im Rahmen von Immunreaktionen und entzündlichen Prozessen spielt (Oliver et al., 1999; Kameoka et al., 2000). PARP-1^{-/-} - Mäusen fehlt die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte TNF- α -Produktion, iNOS-Expression und NO-Produktion und erwiesen sich äußerst resistent gegenüber septischen Schock. Die der iNOS-Expression zugrundeliegende Ko-Transaktivatorfunktion der NF- κ B-gesteuerten Transaktivierung war dabei nur teilweise von der katalytischen Funktion der PARP abhängig, und NF- κ B und die PARP-1 bildeten einen stabilen Komplex, unabhängig von der DNA-Bindung (Kameoka et al., 2000).

1.2.3 Alterungsprozesse

Noch bevor durch die Entdeckung der Tankryase eine direkte molekulare Verbindung von Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Reaktionen mit zellulären Mechanismen der Alterungsregulation bekannt war, gab es phänomenologische Untersuchungen zur Bedeutung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung beim Alterungsprozess: Statistische Untersuchungen konnten im Speziesvergleich bei Säugern eine hohe Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Kapazität mit der Lebensdauer korrelieren (Muiras et al., 2000; Grube et al., 1992). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Kapazität bei Menschen und bei Ratten mit dem Alter abnimmt (Grube et al., 1992). Bei Patienten mit dem schweren Krankheitsbild der Progeria, das zu stark

beschleunigtem Altern und zum Phänotyp eines Greisen bereits im späten Jugendalter führt, konnte eine deutlich verminderte PARP-1-Expression in Fibroblasten nachgewiesen werden (Ly et al., 2000). Im Hippocampus von alten Ratten war die PARP-Aktivität um etwa 50% im Vergleich zu Hippocampi erwachsener Ratten vermindert, während in Cortex und Cerebellum keine Änderung gemessen werden konnten (Strosznajder et al., 2000). Eine altersabhängige Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Kapazität konnte auch in Lymphozyten von Ratte und Mensch beobachtet werden (Grube et al., 1992).

Da bisher noch keine funktionellen Untersuchungen zum Alterungsprozess nach Ausschaltung oder Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung vorliegen, ist das Aufstellen einer kausalen Beziehung zwischen Poly(ADP-Ribosyl)ierung und Verhinderung der Zell- oder Gewebeeralterung bisher nicht möglich. Auch würde die annähernd normale Lebenserwartung von PARP-1^{-/-} - Mäusen gegen eine kausale Bedeutung der PARP-1 im Alterungsprozess sprechen, während auf der anderen Seiten durch Fehlen eines Knock-out-Tieres die Beteiligung der Tankryase nicht eingeschätzt werden kann. Umgekehrt könnten die bisherigen Studien umsomehr auf eine Beeinträchtigung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung im Alterungsprozess schließen lassen, womit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit genomischer Instabilitäten und damit maligner Entartung im alternden Organismus verbunden sein könnte.

1.2.4 Apoptose

Die Apoptose ist der programmierte, energieabhängige und über definierte Signalwege ablaufende Zelltod. Diese Art des Zelltodes ist physiologisch aufs engste mit Wachstums- und Entwicklungsprozessen verbunden und führt in keinem Falle zu einer für das betroffene Gewebe schädlichen sekundären inflammatorischen Reaktion. So werden beispielsweise während der Entwicklung des ZNS mehr als doppelt so viele Neurone gebildet, als im adulten Organismus vorhanden sind (Oppenheim et al., 1991). Die apoptotische Degeneration dieser Neurone erfolgt während der Entwicklung ohne jegliche inflammatorische Komponente.

Eine zentrales Ereignis der Apoptose ist die proteolytische Spaltung der PARP-1 in der DNA-bindenden Domäne in ein 89 kDa- und ein 24 kDa-Fragment (Kaufmann et al., 1993). Dadurch wird die Kopplung der regulatorischen DNA-bindenden Domäne an die katalytische Domäne aufgehoben. Diese PARP-1-Spaltung ist ein weit verbreiteter

und etablierter Marker der Apoptose, unabhängig von ihrer funktionellen Bedeutung, die erst in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnte:

So interagiert nämlich das bei der apoptotischen PARP-1-Spaltung entstandene 89 kDa-Fragment mittels eines BRCT-Motivs mit der Automodifikations-Domäne und hemmt dadurch die PARP-1-Aktivität durch Blockierung der Dimerisierung (Kim et al., 2000). Darüberhinaus wird durch die Spaltung und Inaktivierung der PARP-1 die Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-abhängige Hemmung der Chromatin-gebundenen Ca/Mg-Endonuclease DNASE1L3, die zur DNA-Fragmentierung während der Apoptose beiträgt, aufgehoben (Yakovlev et al., 2000). Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist, daß eine Verhinderung der PARP-1-Spaltung während der Apoptose sofort nach Beginn der DNA-Fragmentierung zu deren drastischen Aktivierung und damit zum zellulären Energie-Defizit führen würde, das die Ausführung der Apoptose unmöglich machen würde und die Zelle in einen nekrotischen Tod treiben würde (Herceg et al., 1999). So sind beispielsweise PARP-1^{-/-} - Mäuse gegenüber dem durch MNNG und H₂O₂ - induzierten nekrotischen Zelltod geschützt (Ha et al., 1999). PARP-1-Inhibition oder -Depletion verhindert auch den nekrotischen Zelltod bei N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-induzierter Neurodegeneration, zerebraler Ischämie (Endres et al., 1997; Eliasson et al., 1999), Myokard-Ischämie (Zingarelli et al., 1997; Pieper et al., 2000) und Streptozotocin-induziertem Diabetes (Burkart et al., 1999; Masutani et al., 1999). PARP-1^{-/-} -Mäuse sind aber nicht gegenüber dem Fas-induziertem apoptotischen Zelltod geschützt (Ha et al., 1999), und die Hemmung der PARP-1 verhindert auch nicht den Zelltod durch Apoptose-induzierende Substanzen, z.B. durch TNF- α , Dexamethason oder Fas (Leist et al., 1997).

Da durch Depletion von ATP prinzipiell jeder apoptotische in einen nekrotischen Prozess überführt werden kann (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997), stellt also die Spaltung der PARP-1 im Rahmen der Apoptose eine unabdingbare Voraussetzung für ihr ungestörtes Ablaufen dar und verhindert das Umschlagen des gezielten apoptotischen Prozesses in einen nekrotischen Prozess, der durch die ausgelöste inflammatorische Reaktion fatale Konsequenzen für das umgebende Gewebe hätte.

1.3 Die Rolle der Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei der Tumorthherapie

Tumorzellen sind im Rahmen von Chemotherapien oxidativen Schädigungen ausgesetzt (Sinha et al., 1990; Davies et al., 1986; Doroshow et al., 1986; Marcillat et al., 1989). Dabei führt der intrazelluläre Metabolismus des Chemotherapeutikums oder seine Beteiligung an Redox-Cycling-Reaktionen, speziell in unmittelbarer Nachbarschaft zum Chromatin, zu einer Produktion von freien Radikalen (Sinha et al., 1990; Davies et al., 1986; Marcillat et al., 1989; Feinstein et al., 1993). Diese Sauerstoffradikale reagieren nun mit Strukturen des Chromatins, zum einen mit der DNA, was zu DNA-Strangbrüchen oder Oxidation von Nukleobasen führt, aber auch zum anderen mit den die DNA zu Nukleosomen organisierenden Proteinen, den Histonen. Die erwünschte DNA-Schädigung in Tumorzellen nach Chemotherapie kann aber auch Folge der direkten Reaktion der zytotoxischen Substanz mit der DNA sein, z.B. im Falle der Alkylantien (Goria-Gatti et al., 1992). Diese Chemotherapie-induzierte oxidative Modifikation von Nukleosom-Proteinen im Zellkern kann zur Oxidation von Aminosäureseitenketten, zur Bildung von Protein-Protein-Crosslinks und zur Bildung von Protein-DNA-Crosslinks führen (Jones et al., 1993; Altmann et al., 1995). In diesem Zusammenhang werden die nukleosomalen Histone auch als ein Schutzsystem der DNA vor oxidativen Schäden angesehen (Enright et al., 1992).

Die Histone stellen nun aber nicht allein ein "Verpackungs- und Schutzsystem" für die DNA dar, sondern sind intensiv in chromatindynamische Prozesse wie Transkription, Replikation und Reparatur funktionell eingebunden (Realini et al., 1992; Jeggo et al., 1998). Da zu erwarten ist, daß im Rahmen eines radikalischen Angriffs auf das Chromatin die oxidative Schädigung der Histone mit einem Funktionsverlust verbunden ist, würde es Sinn machen, daß diese geschädigten Histone mit hoher Effizienz abgebaut werden und durch neue, intakte ersetzt werden. Bisher gab es aber keine Untersuchungen zum Abbau und Turnover geschädigter Histone, die verantwortliche Protease war unbekannt, ebenso wie deren mögliche Regulation und Einbindung in das Reparatur-Netzwerk nach einem genomischen Schaden. Das erstaunt umso mehr, da doch die Mechanismen der DNA-Reparatur schon lange Gegenstand intensiver Forschung sind, während aber geschädigte Histone nicht nur epigenetische Funktionen wie DNA-Transkription, -Replikation und -Reparatur entscheidend stören

können, sondern auch selber direkt durch Crosslinking mit der DNA einen genomischen Schaden verursachen können (Jones et al., 1993; Dizdaroglu et al., 1993).

Histone werden in proliferierenden Zellen nicht nur in limitierten Phasen des Zellzyklus, sondern konstitutiv synthetisiert, gerade auch in nicht-proliferierenden Zellen (Waterborg et al., 1993). Früher berichtete Turnover-Raten von Histonen differieren beträchtlich hinsichtlich Zelltyp oder Kultivierungsbedingungen, von 18 h für Histon H1 in L5178Y Maus-Lymphomzellen (Higurashi et al., 1987) bis zu 136,6 d für Histon H4 in proliferierenden Friend-Zellen (Tsvetkov et al., 1989). In jedem Falle aber ist zu erwarten, daß aufgrund der langen Lebensdauer der Histone derartige proteolytische Prozesse hochselektiv und sehr exakt reguliert ablaufen müssen.

Eine bisher bekannte Protease, die in der Lage ist, oxidativ geschädigte Proteine selektiv zu erkennen und abzubauen, ist das Proteasom: Ein etwa 700 kDa großer, ubiquitärer, multikatalytischer Proteinasekomplex (Davies et al., 1987; Coux et al., 1996; Grune et al., 1995). Für das Zytoplasma ist bereits bekannt, daß oxidativ geschädigte Proteine einem selektiven proteolytischen Abbau über einen ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Weg durch das 20S-Proteasom unterliegen (Grune et al., 1997). Das Proteasom ist aber neben seiner zytosolischen Lokalisation auch in großen Mengen im Zellkern vorhanden (Palmer et al., 1996), und interessanterweise besitzen Tumorzellen eine höhere Proteasomaktivität als nichtmaligne Zellen (Kumatori et al., 1990), die ebenfalls vor allem im Nukleus lokalisiert ist. Da ein mögliches System zur Abwehr oxidativer Histonschäden auch gerade von Tumorzellen genutzt werden könnte, um Schäden im Zellkern durch Radio- oder Chemotherapie zu überwinden, könnten derartige antioxidative Abwehrmaßnahmen natürlich auch die Effektivität einer Tumorthherapie reduzieren und an der Therapieresistenz von Tumoren beteiligt sein (Sinha et al., 1990). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zu diesen Fragestellungen zunächst an lebenden, proliferierenden K562-Leukämie-Zellen (Ullrich et al., 1999b; Ullrich et al., 2001d) und anschließend an der zu einem Makrophagen-Phänotyp differenzierenden U937-Leukämiezelllinie (Ullrich et al., 2000b; Ciftci et al., 2001b) vorgenommen, um die dabei gefundenen Mechanismen schließlich in phagozytierenden Mikrogliazellen (Ullrich et al., 2001c) zu bestätigen.

In diesem Zusammenhang muß dann auch die mögliche Rolle der Poly(ADP-Ribosyl)ierung untersucht werden: Denn ausgehend vom bisherigen Kenntnisstand gilt es als sicher, daß die Poly(ADP-Ribosyl)ierung das Überleben von proliferierenden

Zellen ermöglicht, die auf einem moderaten Niveau mit DNA-schädigenden Substanzen wie Alkylantien, Oxidantien und ionisierender Strahlung ausgesetzt worden sind (de Murcia et al., 2000). Auch ist gut bekannt, daß die Hemmung der PARP proliferierende Zellen gegenüber sublethalen DNA-Schäden sensitiviert (de Murcia et al., 2000) und die Zytotoxizität des Topoisomerase I - Inhibitors Camphothecin potenziert (Bowman et al., 2001). Wenn also eine Rolle der PARP-1 für die Erhaltung der genomischen Stabilität angenommen werden kann, muß in der Konsequenz der oben formulierten Postulate auch untersucht werden, ob neben ihrer gut bekannten Funktion bei der DNA-Reparatur (de Murcia et al., 2000) nicht auch eine Funktion im Abbau oxidierter Histone vorliegt.

Bisher war noch nicht untersucht,

- ob und wie oxidativ geschädigte Histone proteolytisch abgebaut werden und welche Rolle die Interaktion mit der DNA dabei spielt,
- welche nukleäre Protease für den Abbau geschädigter Histone verantwortlich ist,
- wie diese nukleäre Protease unter den Bedingungen oxidativer Belastung reguliert wird,
- wie diese nukleäre Protease unter den Bedingungen verschiedener Differenzierungsstadien der Zelle reguliert wird,
- welche Bedeutung die Histonschädigung und der Histonturnover während der Tumorthherapie hat,
- ob durch Eingriff in diese Prozesse eine Verstärkung der Wirksamkeit chemotherapeutischer Behandlung erreicht werden kann und
- ob und wie die Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei diesen Prozessen regulatorisch beteiligt ist.

1.4 Die Rolle der Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei Erkrankungen des ZNS

1.4.1. Allgemeine Betrachtungen

Seit etwa 1994 wird der Erforschung der Rolle der Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen bei Erkrankungen des ZNS eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Diese gründet sich auf vielversprechende Resultate tierexperimenteller Krankheitsmodelle des ZNS, bei denen der Aktivierung der PARP-1 eine entscheidene Bedeutung zuzukommen scheint: So bietet beispielsweise die Hemmung der PARP-1 die bisher beste Neuroprotektion in Tiermodellen für den Schlaganfall (Ha et al., 2000). Auch weisen PARP-1^{-/-} - Mäuse nach Schädel-Hirn-Trauma geringere kognitive und motorische Defizite auf und sind in einem Parkinsonmodell vollständig gegenüber der 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) induzierten selektive Degeneration dopaminerger Neurone geschützt (Cosi et al., 1996). Diese tierexperimentellen Befunde werden teilweise von Untersuchungen an Autopsiematerial beim Menschen gestützt, die eine erhöhte postmortale Poly(ADP-Ribose)-Konzentrationen nach globaler Ischämie (Love et al., 1999) und auch eine erhöhte Poly(ADP-Ribose)-Konzentrationen bei Patienten mit M. Alzheimer (Love et al., 1999) nachweisen konnten. Die Beteiligung der PARP-1 beim NO-vermittelten exzitotoxischen neuronalen Zelltod nach ischämischer Hirnschädigung wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Snyder von der Johns Hopkins University in Baltimore so eindrucksvoll gezeigt (Zhang et al., 1994), daß nach umfassender patentrechtlicher Sicherung dieser Befunde die Entwicklung von klinisch anwendbaren PARP-1-Inhibitoren von pharmazeutischen Unternehmen massiv vorangetrieben wurde (z.B. Guilford Inc, Agouron/Pfizer Inc.). Aus dieser Entwicklung entstammen viele nun für die Forschung erhältliche hochspezifische Inhibitoren der PARP-1, deren halbinhibitorische Konzentration bis um den Faktor 10⁶ niedriger liegt als bei den PARP-1-Inhibitoren der ersten Generation aus der Gruppe der Benzamide. Vorreiter auf diesem Gebiet ist die von Prof. Snyder gegründete Firma Guilford Inc., die bereits die ersten entwickelten PARP-1-Inhibitoren in klinischen Prüfungen der Phase I am Menschen einsetzt.

1.4.1 Ischämie-Reperfusionsschäden

Die PARP-1 wurde zuerst in Verbindung mit dem NO-induzierten neuronalen Zelltod nach zerebralen Insult gebracht (Zhang et al., 1994): Die fokale Ischämie während eines zerebralen Insults führt zu einem etwa 50-fachen Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration, die über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zur Aktivierung der neuronalen NOS und zur Stimulierung der cGMP-Bildung führt. Das im Rahmen dieser exzitotoxischen Schädigung freigesetzte NO führt zur Aktivierung und Poly(ADP-Ribosyl)ierung der PARP-1 (Zhang et al., 1994). Durch eine Hemmung der PARP konnte nun die NMDA-Rezeptor-vermittelte Glutamat-Toxizität verhindert werden (Zhang et al., 1994; Cusi et al., 1994). Die NMDA-Toxizität ist in kortikalen Neuronen von PARP-1^{-/-} - Mäusen praktisch aufgehoben und in PARP-1^{+/-} Mäusen um 60-70 % reduziert. Dieser Effekt konnte auch durch eine chemische Hemmung mit dem hochpotenten Inhibitor DPQ (3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperinidyl)butox]-1(2H)-isoquinolinon) erreicht werden (Zhang et al., 1994). Weiterführende Arbeiten mit PARP-1^{-/-} - Mäusen zeigten, daß das Infarktvolumen nach Verschuß der A. cerebri media in PARP-1^{-/-} -Mäusen um 78 % (Eliasson et al., 1997) bzw. in einer anderen Studie um 40 % (Endres et al., 1997) reduziert war. Diese Neuroprotektion in PARP-1^{-/-} - Mäusen war größer als durch Behandlung mit NMDA-Antagonisten oder NOS-Inhibitoren (Eliasson et al., 1997; Tokime et al., 1998). Auch hier führte eine chemische Hemmung der PARP mit dem Inhibitor DPQ zu einer deutlichen Neuroprotektion im Sinne einer Verringerung des Infarktgebietes nach Verschuß der A. cerebri media, entweder bei Verabreichung vor oder direkt nach dem Infarkt (Takahasi et al, 1999). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die PARP-1 anscheinend nur eine Rolle in der NMDA-induzierten, nicht aber in der AMPA-induzierten Exzitotoxizität spielt (Mandir et al., 2000).

Alle diese Studien haben mit einer vollständigen Depletion der PARP-1 im ganzen Tier (PARP-1^{-/-} - Mäuse) oder mit einer systemischen und generellen pharmakologischen Hemmung der PARP-1 (durch DPQ) im gesamten Organismus, insbesondere in allen Zelltypen des ZNS gearbeitet. Der von den Autoren angenommene Mechanismus der so erreichten Neuroprotektion stellt die Funktion der neuronalen PARP-1 bei exzitotoxischen neuronalen Zelltod in der Vordergrund und greift dabei auf das vor etwa 15 Jahren entwickelte und gut etablierte Modell der PARP-induzierten Zelltods durch NAD⁺ - und anschließende Energieverarmung zurück

(Berger et al., 1985): Nach zerebraler Ischämie konnte eine erhöhte PARP-Aktivität und erniedrigte ATP-Konzentrationen nachgewiesen werden, während beides durch PARP-Inhibition verhindert werden konnte (Plaschke et al., 2000). DNA-Schaden, PARP-1-Aktivierung und Energie-Depletion bilden zusammen den gemeinsamen finalen Weg der neuronalen Schädigung, so daß bei Hemmung der PARP-1 durch Eingriff in diese gemeinsame Endstrecke die beste Neuroprotektion erreicht werden kann (Ha et al., 2000).

Aber die systemische Hemmung der PARP-1 bei zerebralen Insulten scheint auch mit negativen Auswirkungen auf das neuronale Überleben verbunden zu sein: Denn wenn der neuronale Gesamtschaden nicht unmittelbar nach dem Infarkt, sondern 72h nach einer kurzen, globalen und sublethalen Ischämie bei Ratten gemessen wurde, reduzierte eine systemische PARP-Hemmung die Zahl überlebender Neurone in der hippocampalen CA1-Region (Liu et al., 2000). Eine PARP-Aktivierung ohne nachfolgende NAD^+ -Depletion nach einer transienten Ischämie hat also eine neuroprotektive und keine destruktive Wirkung (Bürkle, 2001). Die anhaltende Erhöhung der PARP-1-mRNA-Expression im Hippocampus von Affen oder Ratten nach einer kurzen globalen Ischämie deutet nach Ansicht weiterer Autoren ebenfalls auf eine Beteiligung der PARP-1 an Reparaturprozessen nach dem initialen Schadensereignis hin (Liu et al., 2000).

Betrachtet man nun die evolutionäre Entwicklung, stellt sich sofort die Frage, warum denn diese besonders hohe PARP-1-Expression in Neuronen überhaupt aufrechterhalten wurde, trotz des Risikos eines katastrophalen Hirninfarktes nach schweren Ischämien. Dieser scheinbare Widerspruch ist nur lösbar, wenn der Gesamtorganismus durch eine hohe neuronale PARP-Aktivität prinzipiell profitieren würde, also der neuronalen PARP eher eine neuroprotektive statt destruktive Funktion zukommt (Bürkle, 2001). Daher können die Ereignisse bei sehr schwerer Ischämie auch hier als das extreme Ende einer Skala zellulärer Abwehrmechanismen gesehen werden, die aufgrund ihrer metabolischen Kosten dann in einen Todesmechanismus konvertieren.

Hier deutet sich also nun an, daß der PARP-1 beim neuronalen Zelltod eine ähnliche widersprüchliche Funktion zukommen könnte wie bei Tumorzelltod: Während auf der einen Seite durch Hemmung der PARP-1 der neuronale Zelltod verhindert werden könnte, könnte auf der anderen Seite durch genau dieselbe Hemmung ein

weiterer neuronaler Schaden induziert werden. In welche Richtung sich die Situation des individuellen Neurons dabei entwickelt, hinge dann bei einer standardisierten Therapie mit PARP-1-Inhibitoren ausschließlich vom Grad der neuronalen Initialschädigung ab, ein klinisch äußerst schwer zu kalkulierender Parameter. So besteht grundsätzlich die Gefahr, daß die Therapie mit systemischen PARP-1-Inhibitoren nicht immer zum erwünschten protektiven Erfolg, sondern auch zu weiterer Destruktion funktionsfähigen Hirnparenchyms führen könnte. Dieses ist umsomehr wahrscheinlich, je später mit dieser Therapie nach dem Initialereignis begonnen wird, also je weniger die akute, auf Energiemangel zurückzuführende Neurotoxizität verhindert wird und je mehr in später ablaufende Reparatursysteme initial überlebender Neurone eingegriffen wird. Aus diesen Gründen schien uns die weit verbreitete Strategie der systemischen PARP-Hemmung bei einem zerebralen Insult als nicht optimal, und es mußten neue pathophysiologische Zusammenhänge betrachtet werden, um zu einer neuen therapeutischen Strategie der PARP-Hemmung bei zerebralen Insulten zu gelangen. Daher erschien es uns sinnvoll, den neuronalen Zelltod nicht isoliert, sondern im Kontext des Gewebeverbandes zu betrachten und dabei eine Zellpopulation zu untersuchen, die an Schadenprozessen im ZNS entscheidend mitbeteiligt ist, die Mikrogliazelle:

1.4.2 Die Rolle der Mikroglia nach primärer neuronaler Schädigung

Mikrogliazellen bilden etwa 5-15 % der gesamten Zellmenge des ZNS und repräsentieren eine Population immunkompetenter Phagozyten innerhalb des Hirnparenchyms, die im gesunden ZNS des erwachsenen Menschen einen „ruhenden“ Phänotyp mit typischer ramifizierter Morphologie aufweisen (Kreutzberg et al., 1996; Perry et al., 1993). Diese „ruhende“ Mikroglia reagiert auf eine Vielzahl pathophysiologischer Ereignisse mit bestimmten morphologischen und funktionellen Veränderungen (Hailer et al., 1996; Hailer et al., 1997; Bechmann et al., 1997). Als frühe Antwort auf Verletzungen und Infektionen des ZNS verwandelt sich die „ruhende“ Mikrogliazelle in eine „aktivierte“ immunologische Effektorzelle mit einer nun amöboiden Morphologie und verstärkten Expression des MHC-Komplexes und von verschiedenen Adhäsionsmolekülen. Darüberhinaus produzieren auch aktivierte Mikrogliazellen große Mengen freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale (Colton et al., 1987). Viele pathologische Veränderungen im ZNS, so z.B. beim M. Alzheimer, bei Tumoren oder beim Hirninfarkt sind mit einer Aktivierung von Mikrogliazellen

assoziiert (Yan et al., 1996), die im Rahmen dieser Krankheitsprozesse eine deutlich erhöhte phagozytotische Aktivität, eine verstärkte Expression verschiedener Immunoeffektor-Moleküle und eine hohe Produktion proinflammatorischer und zytotoxischer Faktoren aufweisen (Kreutzberg et al., 1995).

Diese massive Freisetzung toxischer Produkte, vor allem freier Radikale, bringt nun das grundsätzliche Problem mit sich, daß dabei die freisetzende Zelle als erstes geschädigt oder getötet werden könnte. Es stellt sich die Frage, warum gerade die Mikrogliazellen diesem Angriff freier Radikale, dem sie gerade als Bildungsort im noch viel stärkeren Maße ausgesetzt sind, widerstehen können und daher ihre Konversion von der ruhenden zur aktivierten Mikrogliazelle überleben können. Wenn aber aktivierte Mikrogliazellen über einen längeren Zeitraum vital und funktionell aktiv bleiben sollen, kann erwartet werden, daß diese durch besonders effektive antioxidative Systeme geschützt sind. In diesem Zusammenhang wurde zuerst von Sugaya et al. vermutet, daß aktivierte Mikrogliazellen spezielle zelluläre Schutzsysteme aufweisen müssen, um gegenüber besonders hoher oxidativer Belastung resistent zu sein (Sugaya et al., 1997). Erste Hinweise auf eine besondere Resistenz aktivierter Mikrogliazellen gegenüber oxidativer Belastung ergaben sich aus Experimenten, die eine höhere Resistenz gegenüber NO (Sugaya et al., 1997) beschrieben, während ruhende Makrophagen leicht durch NO getötet werden konnten (Messmer et al., 1995). Erste Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen des besonderen antioxidativen Schutzes von Mikrogliazellen gibt es seit 1998, als über eine verstärkte Expression der Glutathion-Peroxidase (Lindenau et al., 1998) und der mitochondrialen Mn-Superoxiddismutase (Noack et al., 1998) in aktivierten Mikrogliazellen berichtet wurde. Diese primären antioxidativen Schutzsysteme reagieren dabei direkt mit toxischen Sauerstoffradikalen. Spezielle aktivierungabhängig-regulierte sekundäre Schutzsysteme, die bereits geschädigte DNA oder Proteine in Mikrogliazellen abbauen oder reparieren können, waren bisher nicht bekannt.

In Säugerzellen werden oxidativ geschädigte Proteine hauptsächlich über einen ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Stoffwechselweg über das 20S Proteasom abgebaut (Grune et al., 1997). Es gibt nun Hinweise, daß sich die funktionellen Eigenschaften des Proteasoms während der Mikrogliaaktivierung verändern. So wurde beispielsweise in aktivierten Mikrogliazellen nach Behandlung mit Interferon- γ oder LPS der Austausch von 3 konstitutiven β -Untereinheiten durch die Immunoproteasom-Untereinheiten

iβ1/LMP1, iβ2/MECL-1 und iβ5/LMP7 beobachtet, wodurch das Proteasom an die Erfordernisse der optimalen MHCI-Epitop-Expression angepaßt wird (Stohwasser et al., 2000). Da aus Vorarbeiten bekannt war, daß Zellen mehrere Tage mit komplett in den 20S- und 19S-Anteil dissoziiertem und inaktiven 26S Proteasom überleben können (Reinheckel et al., 2000), während ein Aktivitätsverlust des 20S Proteasoms mit schweren Folgen für die Vitalität und das Überleben der Zelle verbunden ist, und dieses 20S Proteasom zudem noch äußerst resistent gegenüber oxidativer Belastung ist, scheint diese Protease ein geeigneter Kandidat, von aktivierten Mikrogliazellen als antioxidatives Schutzsystem eingesetzt zu werden. Wir haben daher die Untersuchung des mikroglialen 20S Proteasoms und seine Regulation in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Mikrogliazelle in den Mittelpunkt der nachfolgenden Untersuchungen gestellt.

Bisher war noch nicht untersucht,

- ob es nach Aktivierung von Mikrogliazellen zu einer verstärkten Proteinoxidation kommt,
- ob die aktivierte Mikrogliazelle dieser verstärkten Proteinoxidation einen erhöhten Proteinturnover entgegensetzt,
- welche mikrogliale Protease für den Abbau oxidativ geschädigter mikroglialer Proteine verantwortlich ist,
- ob und wie diese verantwortliche Protease in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Mikrogliazelle reguliert wird und
- ob diese Systeme das Überleben der aktivierten Mikrogliazelle unter den Bedingungen oxidativen Stresses ermöglicht.

Die Aktivierung von Mikrogliazellen ist mit einer starken Freisetzung von freien Radikalen verbunden (Colton et al., 1987; Hu et al., 1995). Diese können nun natürlich nicht nur auf die Mikrogliazelle toxisch wirken, sondern vor allem auch auf Neurone und dadurch einen deutlichen neuronalen Schaden verursachen (Schubert et al., 1998). Daher kann die nach einem neuronalen Initialschaden zu beobachtene Invasion aktivierter Mikrogliazellen in die Regionen neuronaler Schädigung (Heppner et al., 1998) grundsätzlich für ursprünglich überlebende Neurone eine gefährliche Situation darstellen. Daher sollte die Funktion der PARP-1 nicht allein in Neuronen, sondern auch vor allem in Mikrogliazellen untersucht werden, um Hinweise auf den bisher noch

völlig unbeachteten Anteil der Mikrogliazellinvasion innerhalb des neuronalen Gesamtschadens in den bisher verwendeten Tiermodellen zu erhalten. Während es für das ZNS bisher nur undeutliche Hinweise auf eine Beeinflussung der Invasion immunkompetenter Zellen und damit der neuroinflammatorischen Komponente im Zusammenhang mit der durch Hemmung der PARP-1 erzielten Neuroprotektion gibt (reduzierte Invasion neutrophiler Granulozyten bei PARP-Hemmung vor ischämischer Hirnschädigung bei neugeborenen Ratten, Ducrocq et al., 2000), existieren für das periphere Körpergewebe bereits klare Anhaltspunkte für eine wesentliche Bedeutung der PARP-1 bei entzündlichen Prozessen:

1.4.3 Die Bedeutung der PARP bei der inflammatorische Sekundärschädigung

Ein Großteil des Gewebeschadens beim Myokardinfarkt entsteht durch freie Sauerstoffradikale, einschließlich NO, Superoxidanionen und Peroxynitrit (Kukreja et al., 1992; Wang et al., 1996). Nach Behandlung mit PARP-Inhibitoren (Bowes et al., 1998) oder in PARP-1^{-/-} - Mäusen (Pieper et al., 2000; Zingarelli et al., 1998) wurde eine reduzierte Infarktgröße gemessen. Interessanterweise führen die Autoren aber hier diesen protektiven Effekt nicht auf eine Wirkung direkt in der Herzmuskelzelle, sondern auf eine Störung der einwandernden neutrophilen Granulozyten zurück (Zingarelli et al., 1997). Von der gleichen Arbeitsgruppe konnte wenig später gezeigt werden, daß Endothelzellen von PARP-1^{-/-} - Mäusen eine verminderte Expression von P-Selektin und ICAM-1 aufwiesen, was zu einer deutlich reduzierten Invasion von neutrophilen Granulozyten in das geschädigte Gewebe führte (Zingarelli et al., 1998).

Auch bei der erfolgreichen Behandlung der Colitis in IL10^{-/-} - Mäusen mit PARP-Inhibitoren kam es zur Abschwächung der entzündlichen Infiltration (Jijon et al., 2000). Nach Verschuß der A. mesenterica superior wurde nach PARP-Hemmung oder in PARP-1^{-/-} -Mäusen im Darm nicht nur ein geringerer Schleimhautschaden und eine geringere Hyperpermeabilität, sondern auch eine geringere Invasion neutrophiler Granulozyten beobachtet (Liaudet et al., 2000).

Im Rahmen des destruktiven Autoimmunprozess des Typ-I-Diabetes haben aktivierte Makrophagen eine große Bedeutung in der Exekution des Zelltodes in den Langerhans-Inseln. Hier verhinderten PARP-Inhibitoren oder PARP-1-Gen-Deletion den durch makrophagiale Sauerstoffradikal- oder NO-Produktion induzierten Tod von Inselzellen

im Pankreas (Burkart et al., 1993). PARP-1^{-/-}-Mäuse sind auch gegenüber dem Streptozotocin-induzierten Diabetes gut geschützt (Burkart et al., 1999; Pieper et al., 1999), und sogar in heterozygoten PARP-1^{+/-}-Mäusen war der Krankheitsausbruch deutlich verzögert, so daß bereits eine um 50% geringere PARP-1-Expression sich deutlich günstig auswirkte.

Beim septischen Schock lösen im Blut zirkulierende Endotoxine, hauptsächlich Interferon- γ und Lipopolysaccharid (LPS), die Aktivierung der iNOS durch Bindung eines LPS-responsiven Elementes an die iNOS-Promotorregion aus (Lowenstein et al., 1993). Das daraufhin in großen Mengen freigesetzte NO führt dann zur massiven Vasodilatation und Reduktion des Blutdrucks. Während viele Autoren bereits früher die Rolle der PARP-1 bei septischem Schock und inflammatorischen Erkrankungen beschrieben haben (Szabo et al., 1996, 1997), wurde kürzlich gezeigt, daß PARP-1^{-/-}-Mäuse gegenüber dem Endotoxin-vermittelten septischen Schock über eine Herabregulation der iNOS und NF- κ B-abhängigen TNF- α -Produktion resistent sind (Oliver et al., 1999).

Daher gibt es also in den bisherigen Studien durchaus Anhaltspunkte, daß der PARP-1 in der Regulation und Exekution inflammatorischer Prozesse durch einwandernde Entzündungszellen eine wichtige Bedeutung zukommen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle der PARP-1 in den Makrophagen des ZNS, den Mikrogliazellen, bei exzitotoxischer Hirnschädigung näher betrachtet.

Bisher war noch nicht untersucht,

- ob die PARP-1 in Mikrogliazellen an der Kontrolle der Zellmigration zum Ort der neuronalen Schädigung beteiligt ist,
- über welche migrationsvermittelnden Moleküle die PARP-1 Einfluß auf die Mikroglia migration nehmen könnte,
- über welchen molekularen Mechanismus diese migrationsvermittelnden Moleküle PARP-1-abhängig reguliert werden könnten und
- ob ein Eingriff in diese Mechanismen initial exzitotoxisch geschädigte Neurone vor einer weiteren inflammatorischen Schädigung durch invadierende Mikrogliazellen schützen könnten.

2 Ergebnisse

2.1 Regulation des nukleären Proteasoms durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

2.1.1 Verstärkter proteasomaler Abbau geschädigter Proteine bei oxidativen Stress durch die Poly(ADP-Ribose-Polymerase)

O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol Med.* 31, 887-8983 (2001)

Zunächst wurde untersucht, ob und wie endogene oxidativ geschädigte Histone in lebenden, sich teilenden hämatopoetischen K562-Zellen proteolytisch abgebaut werden: Der endogene Abbau aller nukleären Proteine zeigte sich nach oxidativer Belastung mit H_2O_2 insgesamt erhöht (z.B. 28 % Abbau nach 48 h nach 30 min oxidativer Belastung mit 0,4 mM H_2O_2 im Vergleich zu 17 % Abbau ohne oxidative Schädigung). Auch der Abbau der Histon-Proteine war nach oxidativer Belastung erhöht, wobei Histon H1 die deutlich stärksten Abbauraten aufwies (Abb. 2). Nach Erhöhung der oxidativen Belastung kam es zu einer deutlichen Steigerung hauptsächlich des initialen Abbaus innerhalb von 30 min nach Zugabe des Oxidanz, während der weitere Abbau einen langsameren Verlauf als nach geringgradigerer oxidativer Belastung aufwies. Während der Histon-Abbau in ungeschädigten Zellen annähernd eine lineare Kinetik zeigte, verschwanden mehr als die Hälfte aller insgesamt abgebauten Histone nach oxidativer Belastung mit 0,4 mM H_2O_2 innerhalb von 6 h, nach Belastung mit 1 mM H_2O_2 sogar innerhalb von 30 min. Dabei wies Histon H1 wiederum die mit Abstand höchsten Abbauraten auf (Abb. 2). Bei näherer Untersuchung dieses kurzen, der oxidativen Belastung unmittelbar folgenden Zeitraumes war bereits nach 5 min ein Abbau von Histonen meßbar. Dabei unterschied sich die Geschwindigkeit des Abbaus von Histon H1 wiederum deutlich von allen anderen Histon-Fraktionen. Dem Histon H1 wird eine spezifische Rolle bei der Transkriptionsregulation und der Assemblierung regulatorischer Nukleoproteinkomplexe zugesprochen (Wolffe et al., 1997; Gunjan et al., 1999; Thomas et al., 1999). Aufgrund des deutlichen proteolytischen Abbaus von Histon H1 konzentrierten wir die weiteren Untersuchungen auf diese Histon-Fraktion und versuchten, die für den Abbau oxidativ geschädigter Histone verantwortliche Protease zu identifizieren:

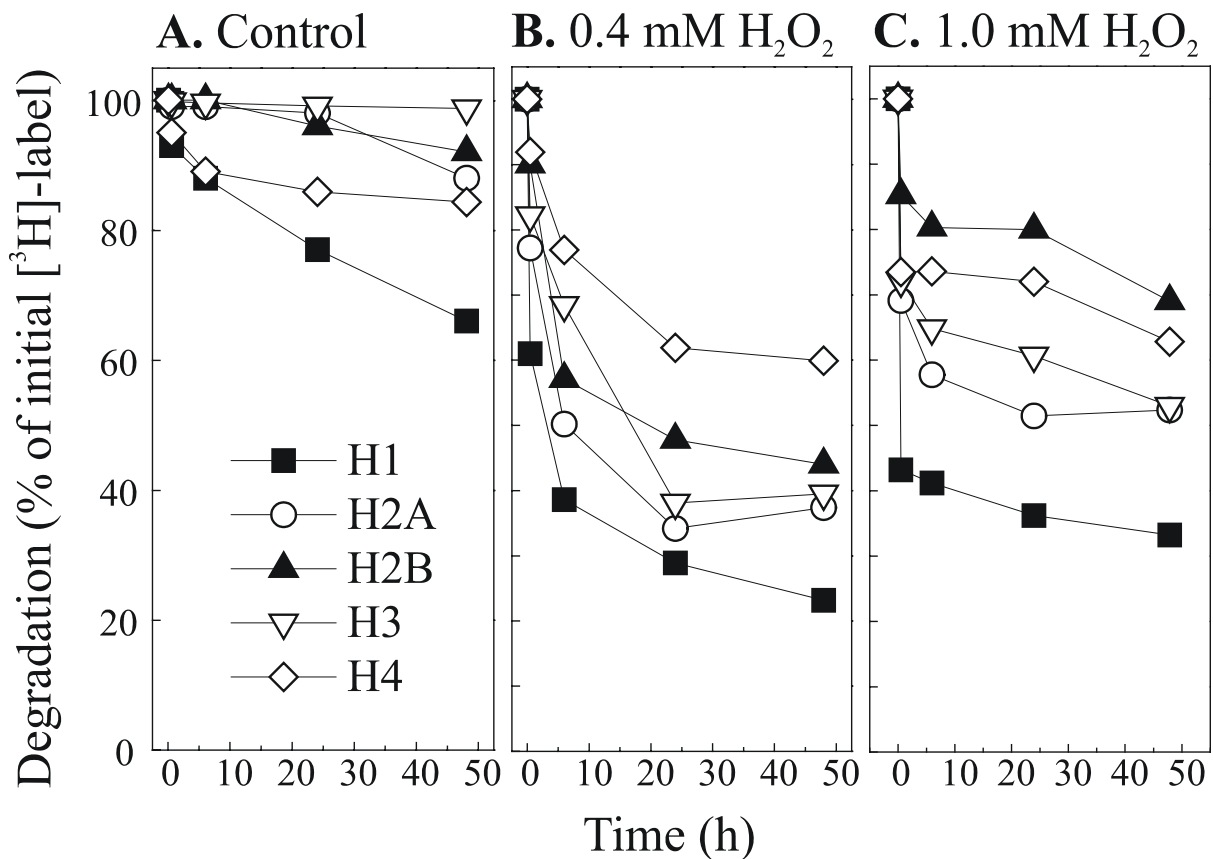


Abb. 2: (aus O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol Med.* 31, 887-8983, 2001): Abbau endogener Histone in K562-Zellen nach oxidativer Belastung. Endogene Proteine wurden mit [³H]-Lysin markiert und nach dem Auswaschen der extrazellulären Radioaktivität mit 0 mM (A), 0,4 mM (B) oder 1 mM (C) H₂O₂ für 30 min oxidativ belastet. Der anschließende Abbau der Histone wurde mittels AUT/PAGE-Analyse der Histonfraktionen nach Isolierung der Zellkerne bestimmt.

Da das Proteasom für den Abbau oxidativ geschädigter zytosolischer Proteine verantwortlich ist, untersuchten wir in weiteren Experimenten den Beitrag des nukleären Proteasoms beim Abbau des endogenen Histons H1 (Abb. 3). Nach Einsatz des hochspezifischen Proteasom-Inhibitors Lactacystin wurde die nach oxidativer Belastung erhöhte Proteolyse von Histon H1 annähernd auf die Abbauraten ungeschädigter Histone reduziert. Die Hemmung der PARP mit dem Inhibitor 3-Aminobenzamid reduzierte nicht die Höhe des Gesamtabbaus von Histon H1 nach 48 h, führte aber zu einer deutlichen Änderung der Kinetik des Histon-Proteolyse: Der schnelle, initiale Abbau innerhalb von 30 min nach Beginn der oxidativen Schädigung wurde deutlich verlangsamt, dafür wurde der initial nicht abgebaute Anteil im weiteren Zeitverlauf von 24 h abgebaut (Abb. 3). Immunopräzipitationen der endogenen Histone und die Analyse ihres Oxidationsgrades mittels Carbonyl-Blot zeigte, daß das Proteasom tatsächlich spezifisch oxidierte Histone abgebaut hat.

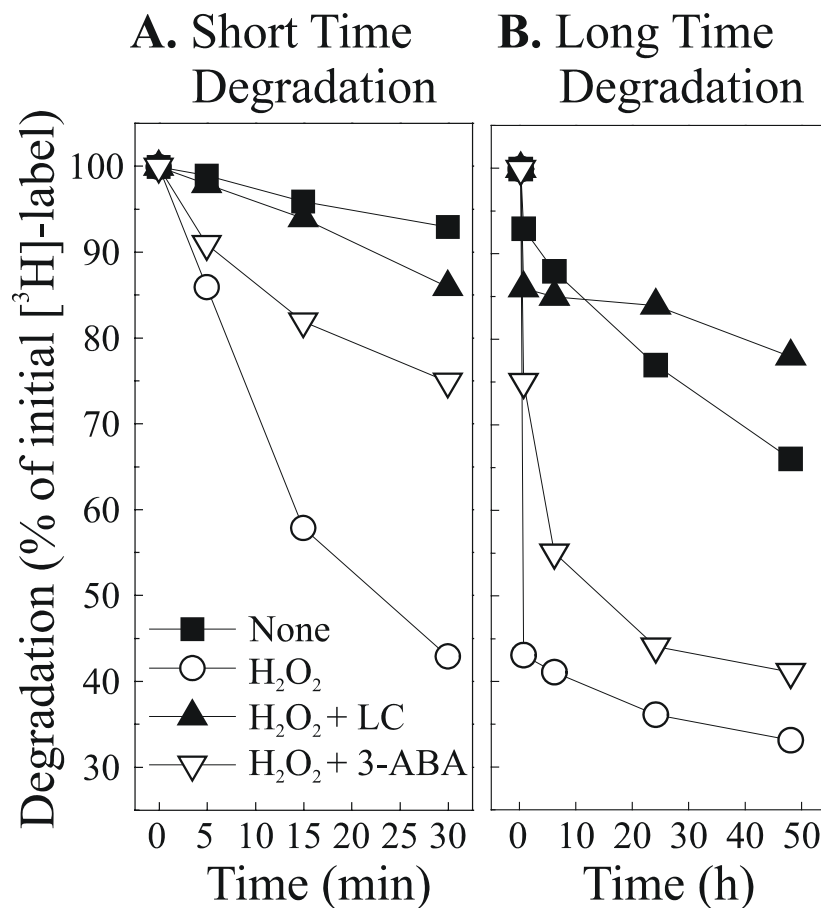


Abb. 3: (aus O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol Med.* 31, 887-8983, 2001): Proteasomaler Abbau von Histone H1 in K562-Zellen nach oxidativer Belastung. Endogene Proteine wurden mit [³H]-Lysin markiert und nach dem Auswaschen der extrazellulären Radioaktivität mit 1 mM H₂O₂ für 30 min oxidativ belastet. Der anschließende Abbau der Histone wurde mittels AUT/PAGE-Analyse der Histonefraktionen nach Isolierung der Zellkerne im Zeitraum bis 30 min (A) und bis 48 h (B) bestimmt. LC = Inkubation mit 5 µM des spezifischen Proteasominhibitors Lactacystin, 3-ABA = Inkubation mit 1 mM des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid

O. Ullrich et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 211-216 (1999)

Weitere Experimente konzentrierten sich auf den Einfluß der DNA-Bindung auf den proteolytischen Abbau oxidativ geschädigter Histone. Dazu wurde in Ergänzung zu den in lebenden Zellen durchgeführten Studien der Abbau isolierter Histone untersucht: Die proteolytische Abbaubarkeit isolierter Histone stieg nach Oxidation an und fiel nach Erreichen eines Maximums wieder ab. Nach Erreichen eines Optimums an proteolytischer Suszeptibilität (z.B. die 7,8-fache Abbaubarkeit nach Oxidation isolierten Histons H2B mit 15 mM H₂O₂) führte weitere Oxidation wieder zu einer verringerten Abbaubarkeit. Beim Vergleich der proteolytischen Abbaubarkeit aller Histonefraktionen fiel eine 4-5-fach höhere basale Abbaubarkeit des Histons H1 auf. Da nur ein geringer Teil aller Histone im Zellkern in gelöster Form vorliegen, wurde

anschließend die Abbaubarkeit DNA-gebundener Histone untersucht. Dazu wurde mit EcoRI linearisierte pGEM-Plasmid-DNA mit Histonen beladen, mit H₂O₂ oxidativ belastet und im Electrophoretic Mobility Shift-Assay (EMSA) untersucht. Nach oxidativer Belastung dieser in vitro-rekonstituierten DNA-Histon-Komplexe mit 5 mM H₂O₂ kam es zur Ablösung von etwa 35% der zuvor gebundenen Histone von der DNA. Stärkere Oxidation reduzierte wiederum diese Ablösung aufgrund der Ausbildung von DNA-Histon-Crosslinks. Nach Oxidation mit 5 mM H₂O₂ wurden praktisch alle zuvor DNA-gebunden Histone durch das isolierte Proteasom abgebaut, stärkere Oxidation verringerte wiederum die Abbaubarkeit in gleicher Weise, wie im EMSA Histon-DNA-Crosslinks nachweisbar wurden. Diese in vitro-Studien erbrachten folgende Reihung der proteasomalen Abbaubarkeit der einzelnen Histonfraktionen (höchste Abbaubarkeit zuerst): H1 > H4 > H3 > H2A > H2B.

O. Ullrich et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6223-6228 (1999)

Aufgrund der in unseren vorangegangenen Studien festgestellten zweiphasigen Kinetik des proteolytischen Abbaus oxidativ geschädigter Histone, die aus einer sehr schnellen, innerhalb von 30 min ablaufenden Komponente und einer langsamen linearen Komponente innerhalb von Stunden bis Tagen nach dem Schädigungsereignis bestand, sollte nun die für diesen schnellen Abbau verantwortliche Protease sicher identifiziert und ihre Regulation unter den Bedingungen oxidativer Belastung untersucht werden. Dazu wurden K562-Zellen metabolisch über 5 Tage mit [³H]-Lysin markiert, anschließend über 30 min mit 0,4 bzw. 1 mM H₂O₂ oxidativ belastet und der Abbau der endogenen Histone mittels AUT/PAGE gemessen. Untersuchungen zur Zellvitalität nach dieser H₂O₂ – Behandlung erbrachten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen keinen Hinweis auf einen Verlust der Vitalität innerhalb des Versuchszeitraumes. Bereits nach 30 min nach oxidativer Belastung wurden 57,5 % des Histon H1 und zwischen 24 % und 34 % aller anderen Histonfraktionen abgebaut.

Um zu untersuchen, ob diesem gesteigerten Abbau die oxidative Modifikation der Substratproteine oder eine Aktivitätssteigerung der Protease zugrundeliegt, wurde auch die nukleäre Proteasomaktivität während der oxidativen Belastung gemessen: Während bei früheren Untersuchungen die Aktivität des zytoplasmatischen 20S Proteasoms unter vergleichbaren Bedingungen oxidativer Belastung im wesentlichen stabil blieb, kam es beim 26S Proteasom zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (Reinheckel et al., 2000). Überraschenderweise aber konnte hier im Zellkern nicht nur eine gleichbleibende,

sondern sogar eine drastisch gesteigerte Aktivität des Proteasoms direkt nach Beginn der oxidativen Belastung gemessen werden (Abb. 4). Auch in oxidativ belasteten isolierten Zellkernen konnte eine erhöhte Aktivität des 20S Proteasoms und ein um das 4,2-fache verstärkter Abbau oxidativ geschädigter Histone beobachtet werden.

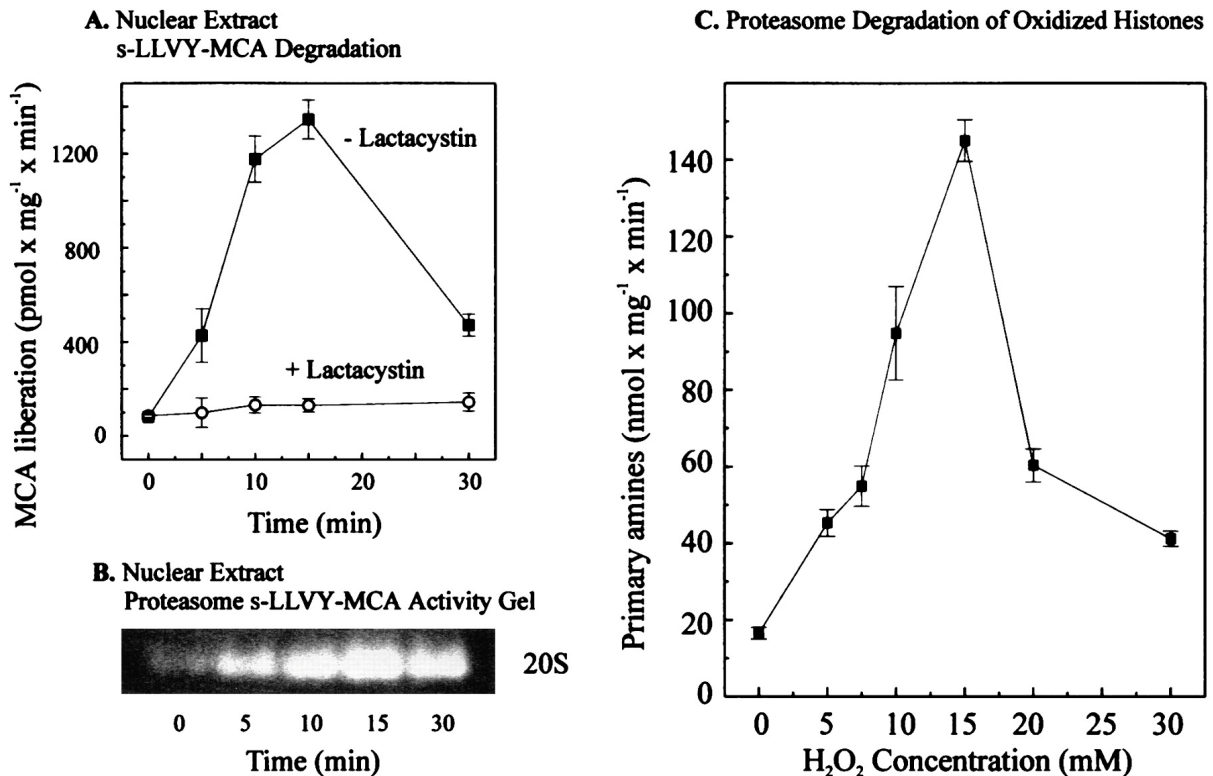


Abb. 4: (aus O. Ullrich et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6223-6228, 1999): Aktivierung des nukleären Proteasoms und erhöhte proteolytische Abbaubarkeit von Histonen nach oxidativer Belastung. **A:** Proteolytischer Abbau des fluorogenen Modellpeptids sLLVY-MCA in Anwesenheit oder Abwesenheit des spezifischen Proteasom-Inhibitors Lactacystin innerhalb von 30 min nach oxidativer Belastung mit 1 mM H₂O₂. **B:** Aktivitäts-Färbung des nativelektrophoretisch getrennten Proteasoms im Blot-Overlay-Verfahren innerhalb von 30 min nach oxidativer Belastung mit 1 mM H₂O₂. **C:** Proteolytische Abbaubarkeit von H₂O₂ – modifizierten Histonen durch das isolierte 20S Proteasom.

Die Inkubation mit 3-Aminobenzamid, einem Inhibitor der PARP, während der oxidativen Belastung der Zellkerne führte zu einer Blockade des gesteigerten Abbaus oxidierter Histone, während der Abbau nativer Histone unbeeinträchtigt blieb. In Nativ-Elektrophoresen isolierter Zellkerne nach oxidativer Belastung wurde im Immunoblot, als auch indirekt über die Inkubation mit [¹⁴C]-NAD⁺ Proteasom-gebundene Poly(ADP-Ribose) detektiert, deren Menge positiv mit der Proteasomaktivität korrelierte (Abb. 5). Eine Immunpräzipitation der PARP-1 aus oxidativ belasteten K562-Zellen führte zur Copräzipitation von Proteasom-Untereinheiten, mit einem Maximum zum Zeitpunkt der höchsten Aktivität des nukleären Proteasoms.

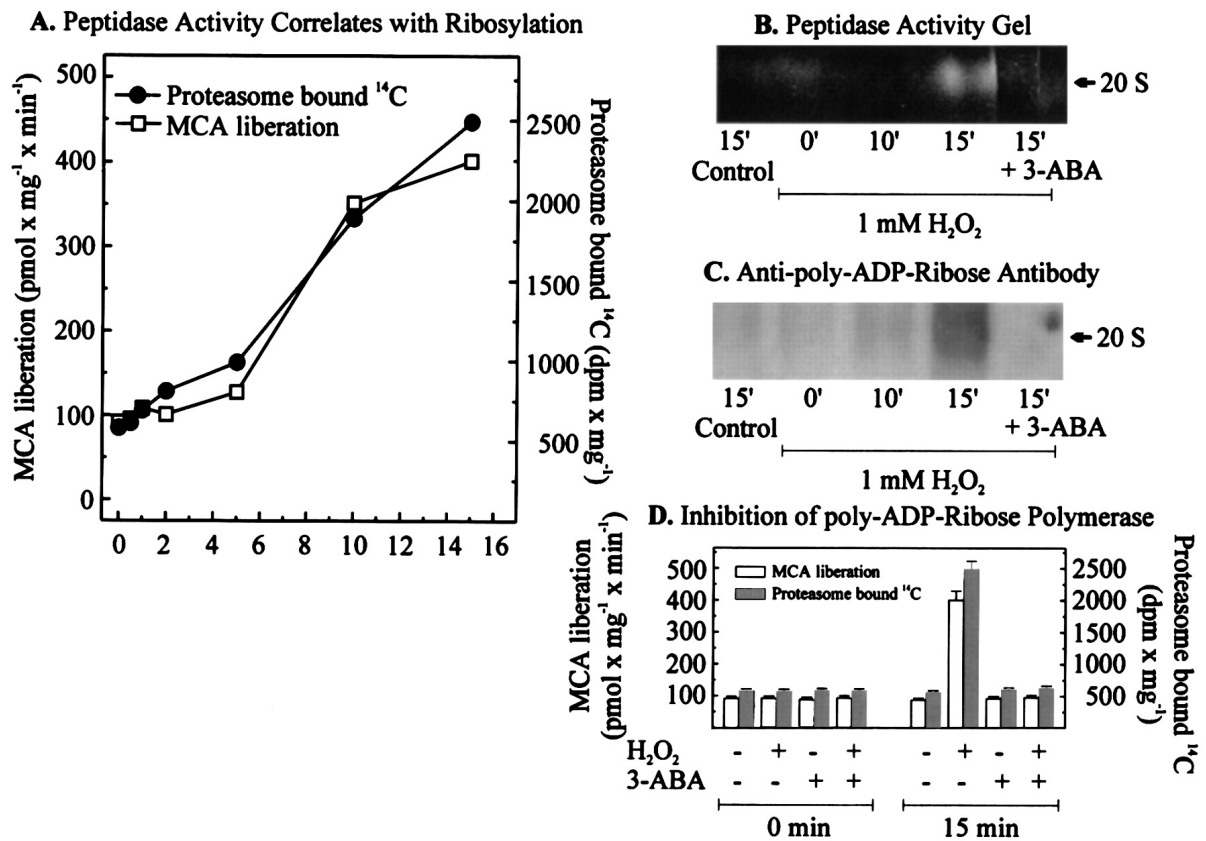


Abb. 5: (aus O. Ullrich et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6223-6228, 1999): Poly(ADP-Ribosyl)ierung des Proteasoms in Zellkernen von K562-Zellen nach oxidativer Belastung mit 1 mM H₂O₂. **A:** Korrelation der proteasomalen Peptidase-Aktivität nach nativelektrophoretischer Analyse mit der Inkorporation von [¹⁴C] in das Protein aus [¹⁴C]-NAD⁺, einem Maß für das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Reaktion. **B:** Nachweis erhöhter Proteasomaktivität in der Aktivitätsfärbung nach nativelektrophoretischer Analyse in Korrelation mit dem Nachweis von Poly(ADP-Ribose) im Immunoblot (**C**). **D:** Einfluß der Hemmung der PARP mittels 1 mM 3-Aminobenzamid (3-ABA) auf die proteasomale Proteolyse des fluorogenen Modellpeptids sLLVY-MCA und die Inkorporation von [¹⁴C] in das Protein aus [¹⁴C]-NAD⁺ als Maß für das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung.

Parallel zur Aktivierung des Proteasoms und mit dem Auftreten copräzipitierter Proteasom-Untereinheiten im anti-PARP-1-Immunpräzipitat wurde in Western-Blots der Präzipitate eine Verschiebung der PARP-1-Bande in den Bereich höherer Molekulargewichte beobachtet, was für das Auftreten der automodifizierten Poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1 spricht. Daher konnte hier vermutet werden, daß die Bindung der PARP-1 über Poly(ADP-Ribose) vermittelt wird. In vitro-Rekonstitutionsexperimente mit dem isolierten Proteasom und der isolierten PARP-1 erbrachten den finalen Beweis einer Aktivierung des Proteasoms durch die aktive PARP-1, wobei allerdings die in vitro detektierbare Aktivitätssteigerung deutlich unter den in isolierten Zellkernen oder in ganzen Zellen gemessenen Anstieg der

Proteasomaktivität lag.

O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 487-492 (1999)

Neben freien Sauerstoffradikalen produzieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen im entzündlichen Gewebe auch große Mengen an hypochlorischer Säure (Hazen et al., 1997). Diese wird von dem Enzym Myeloperoxidase aus H_2O_2 und Chloridanionen synthetisiert (Weiss et al., 1982) und liegt mit einem pK_a von 7,53 bei physiologischen pH-Werten zu etwa gleichen Teilen als freie Säure und als Salz vor. Die hypochlorische Säure ist eine der stärksten bekanntesten Oxidantien, zerfällt in wässrigem Milieu zu Singulett-Sauerstoff (Khan et al., 1994) und reagiert mit Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren (Test et al., 1986; Albrich et al., 1981). Während nun der proteosomale Abbau von Proteinen, die mit H_2O_2 , Superoxid und Peroxynitrit modifiziert worden sind, weitgehend untersucht ist (Grune et al., 1995; Grune et al., 1996; Grune et al., 1997; Grune et al., 1998), ist über den proteolytischen Abbau Hypochlorit-geschädigter Proteine noch wenig bekannt. Diese Untersuchungen wurden an der isolierten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) vorgenommen, dem regulatorischen Schlüsselenzym des Pentosephosphatwegs, der das für die Glutathion-Regeneration essentielle Nikotinamid-Dinukleotidphosphat (NADPH) bereitstellt. Die G6PD ist daher ein für die antioxidative Abwehr und das Überleben der Zelle unter oxidativen Stress essentielles Enzym (Ursini et al., 1997).

Nach ansteigender Schädigung mit Hypochlorit kam es zunächst zur enzymatischen Inaktivierung (IC_{50} etwa $0,02 \mu\text{mol OCl}^- / \text{mg Protein}$), dann zum drastischen Anstieg der proteasomalen Abbaubarkeit (ab $0,05 \mu\text{mol OCl}^- / \text{mg Protein}$) und schließlich zur Proteinfragmentation (ab $0,08 \mu\text{mol OCl}^- / \text{mg Protein}$). Diese Sequenz der Ereignisse macht deutlich, daß einer funktionellen Inaktivierung der G6PD direkt der proteolytische Abbau durch das Proteasom nachfolgt, und einer möglichen Proteinfragmentierung vorausgeht. Das 20S Proteasom zeigte sich hierbei auch gegenüber Hypochlorit äußerst resistent und ein progredienter Aktivitätsverlust war erst oberhalb von $0,2 \mu\text{mol OCl}^- / \text{mg Protein}$ zu beobachten.

2.1.2 Molekulare Grundlagen der Proteasomaktivierung durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

P. Meyer-Kuckuk and O.Ullrich et al. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 259, 576-581 (1999)

Weitere Untersuchungen wurden vorgenommen, um den molekularen Mechanismus der Aktivierung des 20S Proteasoms durch die PARP-1 zu identifizieren. Dabei wurde untersucht, ob das isolierte 20S Proteasom in vitro mit der poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1 oder mit der unmodifizierten PARP-1 interagiert. Das 20S Proteasom wurde anschließend mittels Nativ-Elektrophorese und Aktivitätsfärbung sowie im in vitro-Aktivitätsassay, die gebundene Poly(ADP-Ribose) einer elektrophoretischen Kettenlängenanalyse unterzogen.

Dabei zeigte sich nach Inkubation mit der Poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1 eine deutliche Verschiebung des intakten 20S Proteasoms hin zu höheren Molekulargewichten und eine gleichzeitig deutlich erhöhte Aktivität. Am Proteasom konnten Poly(ADP-Ribose)-Polymere identischer Kettenlänge wie an der PARP-1 nachgewiesen werden. Interessanterweise waren diese Befunde nach Inkubation mit von der PARP-1 abgelösten Poly(ADP-Ribose)-Polymeren identisch, nicht aber nach Inkubation mit der unmodifizierten PARP-1, die nicht in der Lage war, an proteasomale Untereinheiten zu binden. Zur Untersuchung der Spezifität dieser Bindung wurden die Experimente auch mit oligo(ADP-ribosyl)ierter PARP-1, mit abgelösten oligo(ADP-Ribose)-Oligomeren (mit etwa 20 ADP-Ribose-Einheiten), und auch mit fragmentierter RNA und DNA durchgeführt. Dabei wurde mit Fragmentgrößen gearbeitet, die der Poly(ADP-Ribose) vergleichbar sind. In keinem dieser Fälle kam es zur Bindung an das 20S Proteasom oder zu seiner Aktivierung. Auch eine kovalente Modifikation des 20S Proteasoms mit Poly(ADP-Ribose)-Polymeren war nicht möglich.

Es konnte also gezeigt werden, daß die automodifizierte PARP-1 über die nichtkovalente Bindung ihrer Poly(ADP-Ribose)-Ketten zu einer Aktivierung des 20S Proteasoms führt. Diese Bindung erfordert darüberhinaus eine bestimmte Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) und ist spezifisch von der Struktur dieser Polymere abhängig.

2.1.3 Endogene Inhibitoren der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

O. Ullrich et al. *Biochem. J.* 315, 705-708 (1996)

Wenn die PARP-1 sowohl über ihre Mitwirkung an der DNA-Reparatur, als auch an der Regulation des Abbaus geschädigter Histone wesentlich beteiligt ist, so stellt sich die Frage, inwieweit dieses Enzym nicht auch durch oxidativen Stress selbst endogen geschädigt oder inaktiviert werden kann. Während die PARP-1 in isolierter Form oxidationsempfindlich ist, scheint sie innerhalb der lebenden Zelle und sogar in isolierten Zellkernen gut gegenüber oxidativen Streß wie z.B. nach Behandlung mit H₂O₂ oder radikalgenerierenden Pharmaka, geschützt zu sein (Ullrich et al., 1999, Ullrich et al., 2000; Ciftci et al., 2001; Ullrich et al., 2001).

Der direkten Wirkung freier Sauerstoffradikale auf zelluläre Funktionen stehen aber auch die Vielzahl indirekter Wirkungen über Sekundärprodukte oxidativen Stresses gegenüber. Diese entstehen vor allem bei der in Zellmembranen ausgelösten Lipidperoxidation aus besonders oxidationsempfindlichen polyungesättigten Fettsäuren, wobei relativ langlebige toxische aldehydische Lipidperoxidaionsprodukte gebildet werden, die als Mediator von Entzündungsprozessen angesehen werden. Diese sind nicht nur relativ langlebig und können daher innerhalb der Zelle in verschiedenen Kompartimenten, Organellen und Strukturen ihre Wirkung entfalten, sondern können die Zellfunktion auf verschiedene Art und Weise beeinträchtigen (Esterbauer et al., 1993).

Unter diesen aldehydischen Lipidperoxidaionsprodukten erweis sich das 4-Hydroxynonenal in pathophysiologischen Konzentrationen (Selley et al., 1992; Esterbauer et al. 1993) als starker Inhibitor der isolierten PARP-1 mit einem K_i von etwa 4 µmol/l. In lebenden primären Zellen (Fibroblasten aus der Kniegelenkssynovia) war bereits eine Konzentration von 1 µmol/l 4-Hydroxynonenal effektiv, um die Poly(ADP-ribose)-Synthese nach Induktion von DNA-Strangbrüchen mit einem Xanthin/Xanthin-Oxidase-System auf 51 % zu senken.

O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1153-1157 (1997)

Da das aldehydische Lipidperoxidaionsprodukt 4-Hydroxynonenal nicht nur die PARP als wichtiges Schlüsselenzym der antioxidativen Abwehrsysteme der Zelle hemmt, sondern auch im Rahmen oxidativer Zellschädigung ständig produziert wird, besteht

nun grundsätzlich die Gefahr der Ausschaltung PARP-abhängiger Schutzsysteme wie die DNA-Reparatur und den Abbau geschädigter Proteine durch Akkumulation von 4-Hydroxynonenal. Daher wurde untersucht, ob und wie dieses Produkt metabolisiert wird.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir die mitochondriale Metabolisierung, vor allem über die Oxidation zu 4-Hydroxynonensäure und Einschleusung in die β -Oxidation und den Zitratzyklus als einen wichtigen Abbauweg identifizieren (Ullrich et al., 1994; Ullrich et al., 1997). Darüberhinaus kommt es noch zur Bildung eines Adduktes mit reduziertem Glutathion und in geringem Maße zur Reduktion zum korrespondierenden Alkohol 1,4-Dihydroxynonen. Aufgrund der vornehmlich oxidativen Metabolisierung des 4-Hydroxynonenals, hauptsächlich in Mitochondrien, kann also angenommen werden, daß ischämisch-hypoxische Prozesse im ZNS zur Akkumulation von 4-Hydroxynonenal und damit zur Beeinträchtigung PARP-regulierter Reparatursysteme führen.

Es konnte also nachgewiesen werden, daß

- oxidativ geschädigte Histone durch das Proteasom selektiv erkannt und abgebaut werden,
- auch mit hypochlorischer Säure geschädigte Proteine vom Proteasom erkannt und abgebaut werden,
- der Turnover von endogenen Histonen nach oxidativer Belastung deutlich ansteigt und dieses die Folge eines erhöhten proteasomalen Abbaus ist,
- das Histon H1 sowohl in vitro als auch in lebenden Zellen einem besonders schnellen und effektiven Turnover nach oxidativer Belastung unterliegt,
- das Proteasom auch in der Lage ist, oxidativ geschädigte DNA-gebundene Histone abzubauen,
- der proteasomale Abbau DNA-gebundener Histone durch das Auftreten von DNA-Histon-Crosslinks verhindert wird,
- das nukleäre Proteasom nach oxidativer Belastung durch die PARP-1 aktiviert wird und danach oxidierte Histone besonders schnell und effektiv abbauen kann,
- diese Aktivierung des Proteasoms auf der nicht-kovalenten Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten der automodifizierten PARP-1 beruht,

- das durch Lipidperoxidation entstehende 4-Hydroxynonenal ein starker endogener Inhibitor und damit negativer Regulator der PARP-1 während oxidativer Belastung ist und
- 4-Hydroxynonenal intrazellulär hauptsächlich mitochondrial metabolisiert wird.

2.2 Mechanismen der antioxidativen Protektion von Tumorzellen durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

2.2.1 Differenzierungsabhängige Regulation der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

O. Ullrich et al. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 995-1004 (2000)

Oxidativer Stress in Zellkern führt zu Histonmodifikationen wie Oxidation von Aminosäureseitenketten, Protein-Protein-Crosslinks und DNA-Protein-Crosslinks (Jones et al., 1993; Altmann et al., 1995), wodurch die Funktionalität der Histone bei DNA-Transkription, -Replikation und -Reparatur empfindlich gestört werden kann. Daher scheint der selektive und spezifische Abbau oxidativ geschädigter Histone eine wichtige Voraussetzung zum Erhalt der genomischen Stabilität zu sein. Da im Rahmen der Tumorthherapie viele Chemotherapeutika über die Induktion von oxidativen Schäden am Chromatin wirken, kann angenommen werden, daß sich auch proliferierende Tumorzellen dieser Systeme bedienen, um eine oxidative Schädigung zu überleben.

In diesem Zusammenhang wurde ein gut charakterisiertes Zellkulturmodell aus differenzierenden und retrodifferenzierenden humanen U937 myelomonocytyären Leukömiezellen verwendet (Rovera et al., 1979; Hass et al., 1989; Hass et al., 1992), die die Untersuchung differenzierungsabhängiger Zellfunktionen in genetisch identischen Zellpopulationen ermöglicht. Darüberhinaus weisen die mittels des Phorbolesters 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) differenzierten U937-Zellen eine Vielzahl von morphologischen und funktionellen Eigenschaften von Makrophagen auf (Hass et al., 1989), so daß diese Untersuchung als Grundlage für die weiteren Arbeiten an Mikrogliazellen, den Makrophagen des Gehirnes, dienen sollen.

Diese mit TPA-differenzierten U937-Zellen verharren für etwa 2-3 Wochen in einer transienten G₀-Wachstumsarretierung. Anschließend verlieren diese makrophagenähnlichen Zellen wieder ihre Differenzierungsmarker, entwickeln einen

undifferenzierten Phänotyp und treten in den proliferativen Zellzyklus ein (Hass et al., 1992). Außerdem wurde eine weitere, den U937-Zellen genetisch identische Zellpopulation untersucht, die aber differenzierungsresistent sind, einen beschleunigten Zellzyklus aufweisen und in Tierexperimenten eine höhere Tumorigenität zeigen, die TUR-Zellen (Hass et al., 1993; Hass et al., 1997).

In unseren Untersuchungen kam es nach Behandlung mit H_2O_2 in proliferierenden U937-Zellen zu einer etwa 2,5-fachen Aktivitätssteigerung des Proteasoms, in differenzierten U937-Zellen, die zudem eine um etwa 40 % reduzierte konstitutionelle Proteasomaktivität aufwiesen, aber nicht. Verschiedene Inhibitorexperimente brachten das Ergebnis, daß diese Proteasomaktivierung von der Aktivität der PARP abhängig war. Während in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium keine Unterschiede in der Expression des Proteasomproteins gefunden wurden, zeigte sich in der Regulation der Expression der PARP-1 eine deutliche Abhängigkeit von Differenzierungsgrad der Zellpopulation, mit einer reduzierten Expression in differenzierten U937-Zellen und einer erhöhten Expression in der differenzierungsresistenten U937-Zellpopulation (TUR-Zellen). Immunpräzipitations-experimente erbrachten den Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion des Proteasoms mit der automodifizierten poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1, die für die beobachtete Aktivitätssteigerung des Proteasoms nach oxidativer Belastung verantwortlich ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß diese PARP-regulierte Proteasomaktivierung oxidativ belastete proliferierende U937-Zellen vor der Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine schützt, während differenzierte U937-Zellen nach oxidativer Belastung sehr schnell und stark oxidativ geschädigte Proteine akkumulieren. Weitergehende Experimente haben gezeigt, daß diese akkumulierenden oxidativ geschädigten Proteine in differenzierten U937-Zellen in der Lage sind, eine Retrodifferenzierung auszulösen (Selle et al., 2001).

Die PARP-Aktivierung folgt relativ streng der Bildung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen (Cantoni et al., 1989). Eine höhere PARP-Aktivität wurde auch in anderen proliferierenden Zellpopulationen im Vergleich zu differenzierten Zellen beobachtet (Tomoda et al., 1992; Kirsten et al., 1991; Bhatia et al., 1996). Hochmaligne schnell proliferierende Zellen scheinen im allgemeinen besonders gut in der Lage zu sein, sich gegen oxidativen Streß zu schützen (Plummer et al., 1994; Toyokuni et al., 1995). Teilweise wurden allerdings auch entgegengesetzte Beobachtungen beschrieben, nämlich eine Erhöhung der PARP-Expression und -Aktivität während der

Differenzierung (Simbulan-Rosenthal et al., 1999; Quesada et al., 1996). Daher sind über die PARP-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad keine allgemeingültigen Aussagen möglich, sondern diese scheint eher von Zelltyp und der Art des Differenzierungsinduktors abhängig zu sein.

2.2.2 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-vermittelte Chemotherapie-Resistenz

Ö. Ciftci and O. Ullrich et al. *Blood* 97, 2830-2838 (2001)

Die chemotherapeutische Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) führt in etwa 60-70 % der Fälle zu einer kompletten Remission. Allerdings erleiden der Großteil der Patienten, die sich nach der Initialtherapie in kompletter Remission befinden, ein das Krankheitsbild deutlich verschlimmerndes Rezidiv (Preisler et al., 1989; Champlin et al., 1987). Daher sind Untersuchungen angebracht, die Effektivität der chemotherapeutischen Initialbehandlung zu verbessern. Chemotherapien zur Behandlung der AML basieren üblicherweise auf dem Nukleosid-Analogon Cytosin-Arabinosid (AraC), dem Topoisomeraseinhibitor Etoposid (VP-16) und einem DNA-interkalierenden und radikal-produzierenden Anthrachinon (z.B. Adriamycin). Die zytotoxische Wirkung der Anthracycline beruht auf der Produktion freier Sauerstoffradikale in unmittelbarer Nähe zum Chromatin aufgrund von Redox-Zyklen oder durch den intrazellulären Metabolismus dieser Substanzen (Sinha et al., 1990; Davies et al., 1986; Marcillat et al., 1989; Feinstein et al., 1993). Frühere Untersuchungen haben Hinweise ergeben, daß durch Inhibition der PARP die tumortoxische Wirkung von chemotherapeutischen Substanzen gesteigert werden kann, wahrscheinlich über die Störung der DNA-Reparatur (Boulikas et al., 1993; Tentori et al., 1998), die Induktion von Resistenz-Molekülen (Chatterjee et al., 1995) oder den Verlust von amplifizierten Onkogenen (Nagao et al., 1991). Die PARP wird daher als vielversprechendes Ziel toxizitätsverstärkender chemotherapeutischer Interventionen angesehen (Ruf et al., 1998; Watson et al., 1998; Boulikas et al., 1993; Berger et al., 1987), vor allem bei der Behandlung mit Anthracyclinen (Kato et al., 1988).

In unseren Arbeiten führte die Behandlung von proliferierenden U937-Zellen mit 10^{-7} M Adriamycin zur einer Steigerung der nukleären Proteasomaktivität auf das etwa 4,3-fache der Ausgangsaktivität mit einem Maximum nach 15 min, während AraC oder VP-16 im Zeitraum von bis zu 24 h keine Erhöhung der nukleären Proteasomaktivität bewirkten. Diese Proteasomaktivierung nach Adriamycin-Behandlung blieb in differenzierten U937-Zellen weitgehend aus und zeigte sich sehr

sensitiv gegenüber einer Hemmung der PARP mittels 3-Aminobenzamid. Immunpräzipitationsexperimente gegen die PARP in Lysaten aus isolierten Zellkernen von Adriamycin-behandelten U937-Zellen verschiedenen Differenzierungsgrades belegten die Protein-Protein-Interaktion der automodifizierten poly(ADP-ribosyl)ierten PARP mit dem 20S Proteasom als ursächlich für die Proteasomaktivierung nach Adriamycin-Behandlung und ihrer differenzierungsabhängigen Unterschiede (Abb. 6).

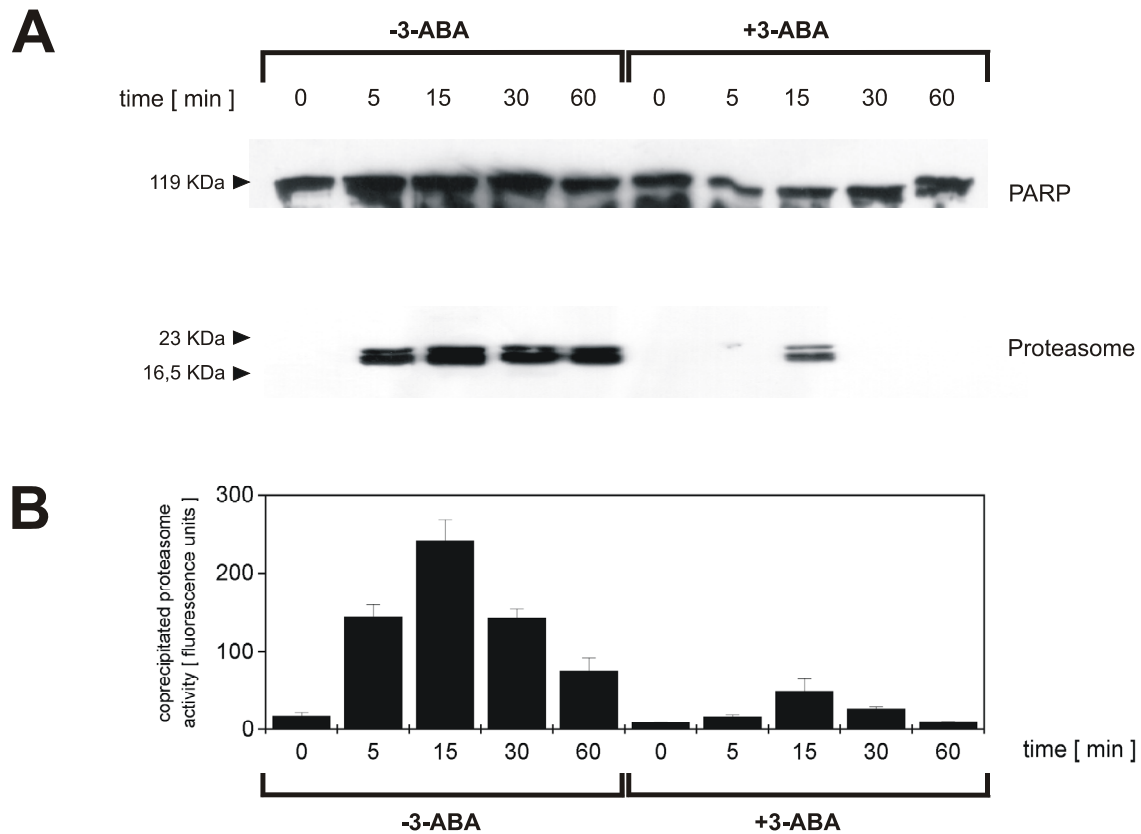


Abb. 6: (aus Ö.Ciftci and O.Ullrich et al. Regulation of the nuclear proteasome activity in myelomonocytic human leukemia cells after adriamycin treatment. Blood 97, 2830-2828, 2001): PARP-regulierte Proteasomaktivierung in humanen U937-Leukämiezellen nach Adriamycin-Behandlung. Proliferierende humane U937-Leukämiezellen wurden für 15 min mit 10^{-7} M Adriamycin in An- oder Abwesenheit des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-ABA) behandelt und die immunpräzipitierte PARP-1 im Immunoblot mit PARP-1 und Proteasom-Antikörpern analysiert (A) sowie die Aktivität des copräzipitierten Proteasoms durch Inkubation mit dem fluorogenen Modellpeptid sLLVY-MCA bestimmt (B).

Zur Untersuchung der Spezifität der beobachteten Effekte wurde in weiteren Experimenten ein antisense-PARP-1-pcDNA3.1-Vektor konstruiert und eine stabil transfizierte U937-Zelllinie hergestellt. Durch antisense-PARP-1-Transfektion konnte die im Vergleich zu U937-Zellen auf um das etwa 25-fache erhöhte halbletale Konzentration LD_{50} von Adriamycin (5×10^{-6} M) auf 2×10^{-7} M und damit auf das Niveau

der U937-Zellen gesenkt werden. Die generelle Hemmung der ADP-Ribosylierungs-Reaktionen mit 3-Aminobenzamid erwies sich hier als noch effektiver und konnte die LD₅₀ noch einmal um den Faktor 4 senken, was auf eine Beteiligung auch anderer PARP-Proteine außer der PARP-1 an der Adriamycin-Resistenz deutet (Ame et al., 1999). Interessant ist, daß anscheinend diese initiale, innerhalb der ersten 30 min nach Beginn der Adriamycin-Behandlung auftretende Aktivierung der PARP entscheidenden Einfluß auf die detektierte Zytotoxizität nach einer Latenz von 24 h zu nehmen scheint.

Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, untersuchten wir, welche oxidativen Schäden an der Zelle zu welchem Zeitpunkt nach Beginn der Adriamycin-Behandlung auftraten und welchen Einfluß die Hemmung der PARP mit 3-Aminobenzamid oder die Ausschaltung der PARP-1 mittels einer stabilen antisense-Transfektion dabei hatte. Dabei waren bei Behandlung mit einer sublethalen Konzentration von 10^{-7} M Adriamycin nach 15 min sowohl DNA-Protein-Crosslinks, als auch DNA-Schäden nachweisbar. Gleichzeitig erreichte die Proteasomaktivität ihr Maximum. Die DNA-Protein-Crosslinks waren nach 1 h abgebaut, während die DNA-Schäden dort ihr Maximum erreichten und anschließend, wahrscheinlich durch nun einsetzende Reparaturprozesse, wieder abnahmen. Im Falle einer Hemmung der PARP oder nach ihrer Ausschaltung mittels stabiler antisense-Transfektion kam es ebenfalls 15 min nach Beginn der Adriamycin-Behandlung zum Auftreten von DNA-Protein-Crosslinks, die dann aber mit der Zeit deutlich akkumulierten. Mit der Nachweisbarkeit von DNA-Protein-Crosslinks kam es auch, allerdings zeitversetzt, nach 24 h zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des 20S Proteasoms, was in einem starken Anstieg der Gesamtmenge an oxidierten Proteinen resultierte.

Interessanterweise erfolgte zwar ein Anstieg der DNA-Schäden bereits nach 15 min, der stärkste Anstieg aber war erst nach 24 h zu verzeichnen. Daher scheint also in der Verhinderung einer initialen Akkumulation von DNA-Protein-Addukten der entscheidende Schlüssel zu Überleben der Zelle zu liegen. Kommt es dagegen zur Akkumulation dieser DNA-Protein-Addukte, wird eine Art sich selbst verstärkende zelluläre Schadenskaskade eingeleitet, bestehend aus der Hemmung des Proteasoms, der Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine und geschädigter DNA. Da das nukleäre 20S Proteasom, wie unsere Arbeiten gezeigt haben, in der Lage ist, innerhalb von wenigen Minuten nach Aktivierung durch die PARP, oxidativ geschädigte Kernproteine selektiv und hocheffektiv abzubauen (Ullrich et al., 1999; Ullrich et al., 1999; Ullrich et al., 2001), kann dadurch die Bildung von Crosslinks mit der DNA und damit die

Initiation dieser zellulären Schadenskaskade verhindert werden. Dieser PARP-regulierten schnellen Aktivierung des 20S Proteasoms innerhalb der ersten Minuten nach Beginn einer zytotoxischen Chemotherapie scheint also eine entscheidene Bedeutung für ihre Wirksamkeit zuzukommen. Experimente mit primären isolierten leukämischen Blasten aus Patienten mit einer AML konnten diese schnelle Aktivierung des 20S Proteasoms nach Adriamycin-Behandlung durch Interaktion mit der PARP-1 bestätigen.

Es konnte also nachgewiesen werden, daß

- die Aktivierung des nukleären Proteasoms nach oxidativer Belastung vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängig ist,
- diese Proteasomaktivierung auch in proliferierenden und retrodifferenzierten humanen Leukämiezellen auf der nicht-kovalenten Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten der automodifizierten PARP-1 beruht,
- die PARP-1-regulierte Proteasomaktivierung oxidativ belastete proliferierende humane Leukämiezellen vor der Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine schützt,
- die Behandlung humaner Leukämiezellen mit Adriamycin ebenfalls zu einer vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängigen PARP-1-regulierten Aktivierung des nukleären Proteasoms führt,
- die Entstehung von DNA-Protein-Crosslinks die Akkumulation von DNA-Strangbrüchen in Adriamycin-behandelten Leukämiezellen fördert,
- die Entstehung dieser DNA-Protein-Crosslinks durch die schnelle und frühzeitige PARP-1-regulierte Aktivierung des Proteasoms verhindert werden kann,
- diese PARP-1-regulierte Proteasomaktivierung auch in leukämischen Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nachweisbar ist und
- nach Ausschaltung der PARP-1 durch antisense-Technik oder nach chemischer Hemmung der PARP die Empfindlichkeit von humanen Leukämiezellen gegenüber Adriamycin deutlich erhöht werden kann und zuvor vorhandene Resistenzen überwunden werden konnten.

2.3 Protektive Funktionen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase in aktivierten Mikrogliazellen

O. Ullrich et al. FASEB J. 15, 1460-1462 (2001)

In diesen Experimenten fanden wir einen erhöhten intrazellulären Proteinabbau in mit TNF- α behandelten, aktivierten, amöboiden BV-2-Mikrogliazellen im Vergleich zu mit α -Tocopherol behandelten ruhenden und ramifizierten BV-2-Mikrogliazellen. Dieser erhöhte intrazelluläre Proteinabbau war hierbei hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, die verantwortliche Protease konnte in Hemmstoffexperimenten als das Proteasom identifiziert werden. Interessanterweise wurde der konstitutive endogene Proteinturnover durch spezifische Hemmung des Proteasoms nicht beeinträchtigt, was darauf hinweist, daß der proteasomale Proteinabbau eher in aktivierten als in ruhenden Mikrogliazellen eine Rolle spielt.

Da das Proteasom in der Lage ist, oxidativ geschädigte Proteine spezifisch zu erkennen und abzubauen, kann ein erhöhter intrazellulärer Proteinabbau entweder aus einem höheren Maß an oxidativer Proteinschädigung oder einer Zunahme der Proteasomaktivität oder aus beidem resultieren. Daher untersuchten wir den Abbau eines in vitro oxidativ geschädigten Modellproteins in Lysaten ruhender und aktivierter Mikrogliazellen, wobei dieses Modellprotein in Lysaten aktivierter Mikrogliazellen deutlich stärker proteasomal abgebaut wurde. Direkte Messungen der Proteasomaktivität mit einem fluorogenen Modellpeptid erbrachten eine 1,6-fach erhöhte Aktivität im Gesamtzelllysat und eine 3,9-fach erhöhte Aktivität in den Zellkern aktivierter Mikrogliazellen. Aktivierte Mikrogliazellen zeichnen sich also durch eine erhöhte proteasomale proteolytische Aktivität im Vergleich zu ruhenden Mikrogliazellen aus.

Aufgrund früherer Studien mit humanen K562-Leukämiezellen (Ullrich et al., 1999b), aber auch mit makrophagenartig differenzierten U937-Zellen (Ullrich et al., 2000) war bekannt, daß das nukleäre Proteasom nach exogener oxidativer Belastung durch Interaktion mit der poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1 aktiviert werden kann. Dennoch konnte bisher noch kein Nachweis erbracht werden, daß auch physiologische Vorgänge ohne direkte exogene oxidative Belastung zu dieser PARP-1-regulierten Proteasomaktivierung führen können, so daß ein Analogieschluß auf die Mechanismen in aktivierten Mikrogliazellen nicht unmittelbar möglich war. Daher untersuchten wir

hier zunächst den Effekt einer Hemmung der mikroglialen PARP-1 mit 3-Aminobenzamid und fanden eine deutlich geringere Proteasomaktivierung in Zellkernen aktivierter Mikrogliazellen. Unter den Bedingungen oxidativer Belastung kam es in NGF-differenzierten und wachstumsarretierten neuronalen PC12-Zellen nicht zur Proteasomaktivierung, wohl aber in aktivierten und proliferierenden BV-2-Mikrogliazellen. Tatsächlich gibt es also Hinweise, daß diese PARP-1-regulierte Proteasomaktivierung ein besonderes Merkmal proliferierender Zellen ist und wahrscheinlich eng mit protektiven, antioxidativen Funktionen verbunden ist, wie es schon im Falle der Adriamycin-Behandlung von myelomonozytären human U937-Leukämiezellen, aber auch in leukämischen Blasten von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie von uns gezeigt werden konnte (Ciftci et al., 2001). Mittels Immunpräzipitationsexperimenten konnte auch im Falle der aktivierten Mikrogliazellen eine funktionelle Interaktion der poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1 mit dem Proteasom demonstriert werden, die zur Aktivierung des Proteasoms führte.

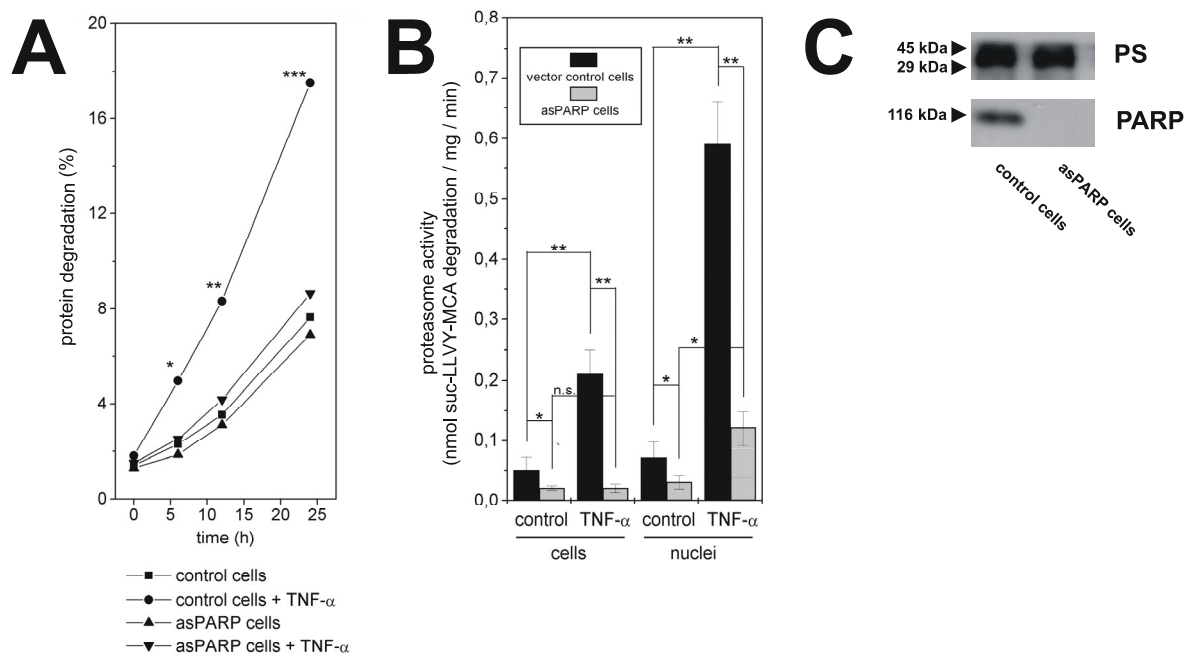


Abb. 7: (aus O. Ullrich et al. FASEB J. 15, 1460-1462, 2001): Spezifische Beteiligung der PARP-1 an der TNF- α -induzierten Erhöhung des Proteinturnovers und der nukleären Proteasomaktivität. A: Proteinabbau in Lysaten isolierter Zellkerne aus stabil mit einem antisense-PARP-1-Vektor transfizierten (asPARP cells) oder mit einem Kontroll-Vektor (control cells) transfizierten BV-2-Mikrogliazellen mit und ohne Stimulation mit TNF- α . B: Lactacystin-sensitive Proteasomaktivität in isolierten Zellkernen. C: PARP-1-Protein-Expression in stabil mit einem antisense-PARP-1-Vektor transfizierten (asPARP cells) oder mit einem Kontroll-Vektor (control cells) transfizierten BV-2-Mikrogliazellen. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$

Um die Spezifität dieser Untersuchungen zu belegen, konstruierten wir einen antisense-PARP-1-pTracerCMV2-Vektor und stellten eine stabil transfizierte BV-2-Mikrogliazelllinie her, in der die PARP-1-Expression komplett supprimiert war (Abb. 7). In diesen antisense-PARP-1-Mikrogliazellen konnte nun, im Vergleich mit den Kontroll-Vektor-transfizierten Mikrogliazellen, kein erhöhter Proteinabbau nach Aktivierung mit TNF- α gemessen werden, und auch die Aktivierung des nukleären Proteasoms war deutlich geringer. Daraus kann gefolgert werden, daß in aktivierten Mikrogliazellen tatsächlich die PARP-1 die nukleäre Proteasomaktivität positiv reguliert.

Da der selektive Abbau geschädigter zellulärer Proteine eine gutbekannte und gut untersuchte biologische Funktion des ATP- und Ubiquitin-unabhängigen 20S-Proteasoms darstellt (Grune et al., 1995; Grune et al., 1996; Grune et al., 1997), könnte die PARP-1-regulierte Aktivierung dieser Protease in aktivierten, phagozytierenden und große Menge an toxischen freien Radikalen produzierenden Mikrogliazellen ein wirksames System zum antioxidativen Selbstschutz darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir das Auftreten oxidativ geschädigter Proteine in aktivierten Mikrogliazellen und fanden keine Akkumulation geschädigter Proteine. Nach spezifischer Hemmung des Proteasoms oder der PARP stellt sich die Situation aber grundsätzlich anders dar: Nun kam es zu einer massiven Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine in aktivierten Mikrogliazellen, die schließlich zum Tod der Zelle führte. In ruhenden Mikrogliazellen allerdings kam es nach Hemmung der PARP zu keiner Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine, und auch eine Hemmung des Proteasoms führte nur zu einem leichten Anstieg. Daraus kann gefolgert werden, daß allein die konstitutive Proteasomaktivität ruhende Mikrogliazellen ausreichend vor oxidativen Schäden schützt.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, daß die PARP-1-regulierte Aktivierung des nukleären Proteasoms ein bereits auf physiologische Bedingungen reagierendes wichtiges antioxidatives Schutzsystem in Mikrogliazellen darstellt.

2.4 Die Funktion der mikroglialen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase in exzitotoxisch geschädigtem lebenden Hirngewebe

O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042 (2001)

Exzitotoxische Hirnschädigungen, z.B. nach Hirninfarkt oder Schädel-Hirn-Trauma, führen zunächst zu einer primären Schädigung von Hirnparenchym. Innerhalb von Stunden bis Tagen nach diesem Ereignis kommt es dann zu einer Invasion aktivierter Mikrogliazellen in die Region des neuronalen Schadens, die dort große Mengen an toxischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen freisetzen und dadurch zu einer weiteren, sekundären neuronalen Schädigung führen (Mabuchi et al., 2000; Stoll et al., 1998). Diese weitere Schädigung initial überlebender Neurone trägt wesentlich zur Gesamtschädigung bei und ist für einen großen Teil der funktionellen Einbußen verantwortlich, die ein Patient nach einem solchen Ereignis erleidet. Daher sollten therapeutische Ansätze nach bereits eingetretenem Primärschaden die Protektion dieser initial überlebenden Neurone vor weiterer sekundärer Schädigung zum Ziel haben.

Es ist gut bekannt, daß es nach einer exzitotoxischen Schädigung von Neuronen zu einer schnellen und ausgeprägten Aktivierung der PARP-1 kommt, die durch die verursachte NAD^+ - und ATP-Depletion das betroffene Neuron in den Tod treiben kann (Zhang et al., 1994). Daher wird die Hemmung der PARP-1 im Hirngewebe nach einem exzitotoxischen Insult als vielversprechende Therapieoption angesehen (Eliasson et al., 1997; Endres et al., 1997; Eliasson et al., 1999; Ha et al., 2000). Auf der anderen Seite aber gibt es viele Hinweise, daß die systemische Hemmung der PARP-1 bei zerebralen Insulten aufgrund der Störung von Reparaturprozessen auch mit durchaus negativen Auswirkungen auf das neuronale Überleben verbunden sein kann (Liu et al., 2000; Bürkle, 2001). So besteht grundsätzlich die Gefahr, daß die Therapie mit PARP-1-Inhibitoren nicht zum erwünschten protektiven Erfolg, sondern auch zu weiterer Destruktion funktionsfähigen Hirnparenchyms führen könnte. Aus diesen Gründen schien uns die weit verbreitete Strategie der systemischen PARP-1-Hemmung bei einem zerebralen Insult als nicht optimal, und wir konzentrierten uns auf die Rolle der Mikrogliazellen im Kontext von Schadenprozessen im Gewebeverband. Da aufgrund unserer Vorarbeiten bekannt war, daß die PARP-1 in phagozytierenden Mikrogliazellen aktiviert ist und diese an der Regulation eines wichtigen mikroglialen antioxidativen

Schutzsystems teilnimmt (Ullrich et al., 2001c), könnte die spezifische Hemmung der PARP-1 eine neue Strategie zur Protektion initial überlebender Neurone vor weiterer Schädigung sein.

Um zu untersuchen, ob eine Herunterregulierung der PARP-1-Expression in Mikrogliazellen zu einem verringerten sekundären neuronalen Schaden führt, mußten wir uns eines Modellsystems bedienen, das die Möglichkeit der direkten Untersuchung von Neuronen und Mikrogliazellen im lebendem Hirngewebe ermöglicht, die organotypische hippocampale Hirnschnittkultur (OHSC). Mit diesem Modellsystem ist es möglich, exogene kultivierte vorbehandelte und vormarkierte Mikrogliazellen auf das Hirngewebe zu transferieren und die Invasion und Migration dieser Mikrogliazellen sowie ihre Interaktion mit Neuronen zu untersuchen (Hailer et al., 1997; Hailer et al., 1998; Heppner et al., 1998).

Zuerst wurde ein antisense-PARP-1-pcDNA3.1-Vektor kloniert und damit BV-2-Mikrogliazellen stabil transfiziert. Diese transfizierten Mikrogliazellen wurden dann im Anschluß an eine exzitotoxische Schädigung mit NMDA auf die Oberfläche von OHSCs transferiert und nach drei Tagen die Migration der Mikrogliazellen in die Regionen neuronaler Schädigung sowie der neuronale Zelltod untersucht. Der nach NMDA-Behandlung auftretende neuronale Schaden (in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus) konnte, wie erwartet und in Übereinstimmung mit den Befunden der Gruppe von Prof. Snyder (Wang et al., 1994; Eliasson et al., 1997), durch chemische Hemmung der PARP im gesamten Gewebeverband reduziert werden, nämlich auf etwa 45 % (Abb. 8a und 8b). Wurden auf den exzitotoxisch geschädigten Hirnschnitt Kontroll-Vektor-transfizierte Mikrogliazellen gegeben, so kam es zu einer annähernden Verdoppelung des neuronalen Gesamtschadens, auch hier konnte durch chemische Hemmung der PARP im gesamten Gewebeverband eine Reduktion des neuronalen Schadens auf etwa 63 % erreicht werden (Abb. 8a und 8b). Wurden nun aber antisense-PARP-1-Mikrogliazellen auf den Hirnschnitt transferiert, blieb trotz Invasion dieser Zellen in das Hirngewebe die Ausbildung eines sekundären Schadens völlig aus, und es konnte überraschenderweise sogar eine Reduktion des Gesamtschadens unter das Niveau der initialen exzitotoxischen Schädigung beobachtet werden (Abb. 8a und 8b). Daher scheint also die spezifische Ausschaltung der mikroglialen PARP-1 im lebenden Hirngewebe eine deutlich protektivere Wirkung auf die Neurone zu haben, als die Hemmung der PARP im gesamten Gewebe.

Warum dieses so ist, untersuchten wir in den folgenden Experimenten: Zunächst prüften wir die naheliegende Hypothese, daß die durch die neuronale Schädigung aktivierte antisense-PARP-1-Mikrogliazellen durch Ausschaltung eines wesentlichen PARP-1-regulierten antioxidativen Schutzsystems ihre eigene Aktivierung nicht überleben (Ullrich et al., 2001c). Allerdings fanden wir keine Hinweise auf eine reduzierte Vitalität der antisense-PARP-1-Mikrogliazellen in den lebenden Hirnschnitten (Abb. 8c und 8d). Diese Ergebnisse stellen uns zunächst vor ein großes Problem, da sie sich doch offensichtlich im Widerspruch zu den Ergebnissen unserer Experimente mit kultivierten antisense-PARP-1-Mikrogliazellen befanden (Ullrich et al., 2001c). Hier zeigte sich besonders deutlich, wie exakt und reproduzierbar in einem Zellkultursystem gewonnen Ergebnisse auch sein können, aber wie wenig weitreichend aber die daraus zulässigen Schlußfolgerung auf die wirkliche physiologische Situation sein dürfen. In jedem Falle aber zwang uns dieser Negativbefund, der noch völlig ungeklärten Frage der Ursache der ausgeschalteten destruktiven Wirkung von antisense-PARP-1-Mikrogliazellen auf den Grund zu gehen.

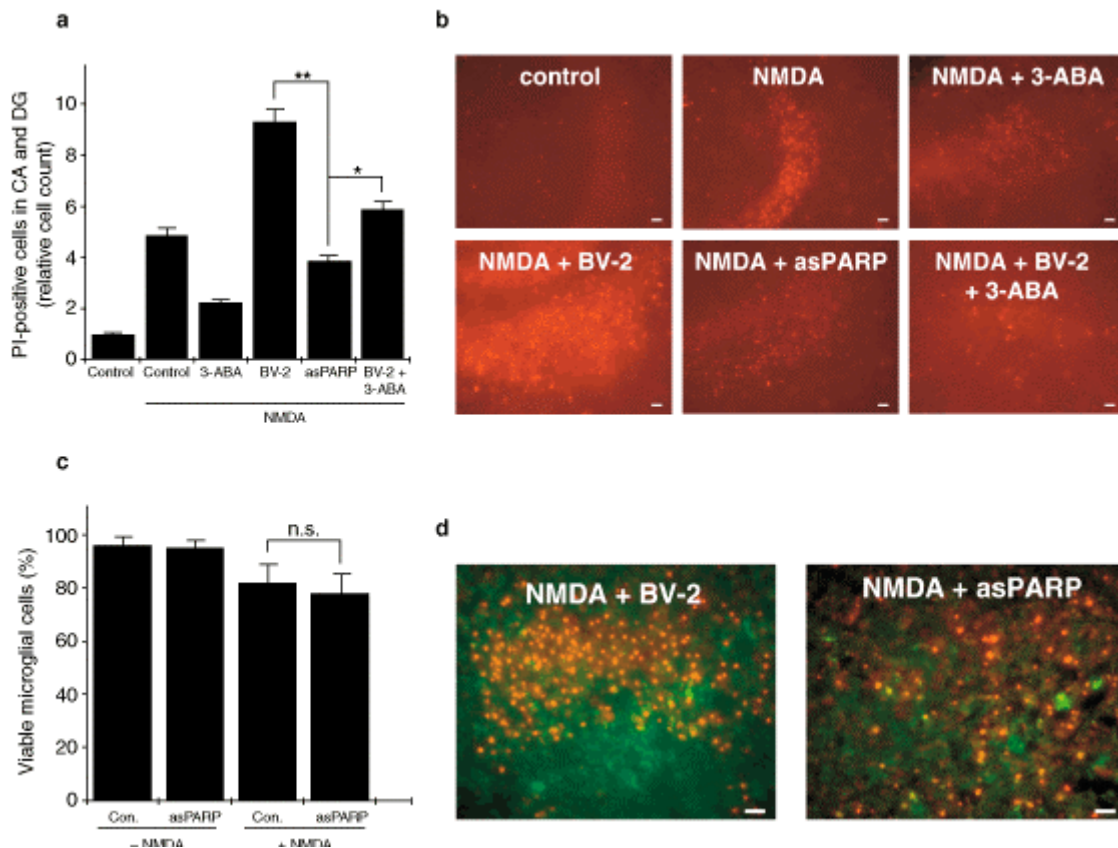


Abb. 8: (aus O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042, 2001): Ausschaltung der PARP-1 in BV-2-Mikrogliazellen schützt vor sekundärem neuronalem Schaden in lebenden organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSCs). a: Propidium-Iodid-positive tote Zellen in den neuronalen Schichten der Degenerationszone im Cornu ammonis und Gyrus dentatus. Zellzahlen relativ zur Zahl in ungeschädigten OHSCs ohne Zugabe von Mikrogliazellen (control=1), nicht-vitale Mikrogliazellen wurden subtrahiert. NMDA: Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA; control = ohne Mikrogliazellen; 3-ABA = ohne Mikrogliazellen, 1 mM 3-Aminobenzamid; BV-2 = mit Kontroll-Vektor-transfizierten BV-2-Mikrogliazellen, asPARP = mit antisense-PARP-1-Vektor transfizierten BV-2-Mikrogliazellen. Mean \pm S.D., n=30, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$. b: Propidium-Iodid-Fluoreszenz-Mikroskopie der neuronalen Degenerationszonen in der CA-Region in lebenden OHSCs vor der Fixierung, Skala = 40 μ m. c: Vitalität der invadierten BV-2-Mikrogliazellen. Mean \pm S.D., n=30, n.s. = nicht signifikant. d: Keine Kolokalisation der Propidium-Iodid-positiven toten Zellen (Rotfluoreszenz) mit Mini-Emerald-vormarkierten BV-2-Mikrogliazellen (Grünfluoreszenz). Skala = 20 μ m

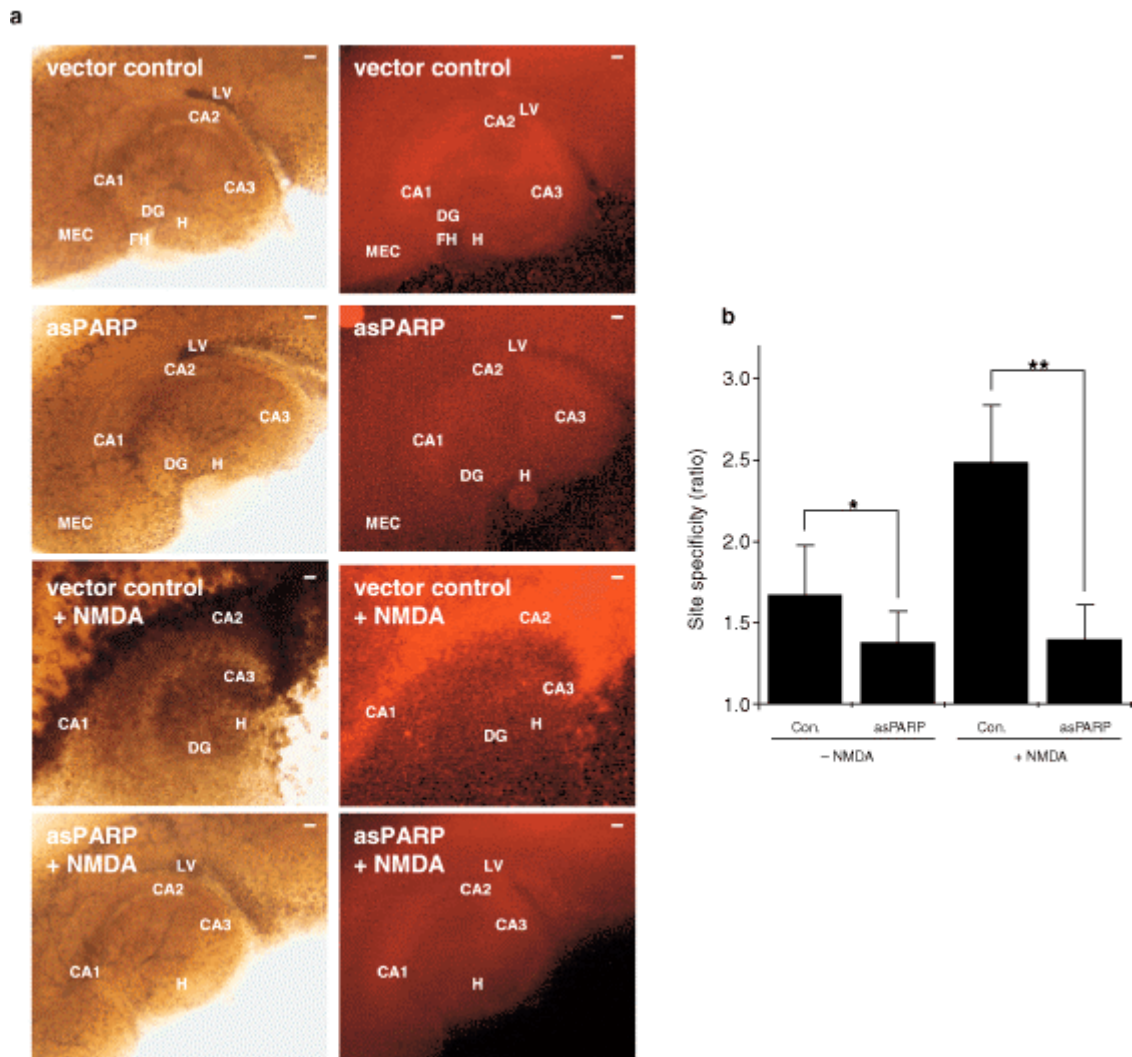


Abb. 9: (aus O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042, 2001): Kontrolle der mikroglialen Migration in die neuronalen Degenerationszonen durch die PARP-1. a: Durchlicht- und Rhodamin-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der lebenden hippocampalen Hirnschnittkulturen (OHSCs). Vector control=Kontroll-Vektor-transfizierte BV-2-Mikrogliazellen, asPARP = mit antisense-PARP-1-Vektor transfizierte BV-2-Mikrogliazellen, NMDA=Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA, LV=linker Ventrikel, H=Hilus, MEC=medialer entorhinaler Kortex, FH=Fissura hippocampi. Skala = 40 μ m. b: Ortsspezifität der mikroglialen Migration zum Ort der neuronalen Schädigung von Kontroll-Vektor-transfizierten BV-2-Mikrogliazellen (Con.) und antisense-PARP-1-Vektor transfizierten BV-2-Mikrogliazellen (asPARP) vor und nach Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA (NMDA). Ortsspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dendatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S.D., n=30, * = p<0,05, ** = p < 0,005.

Daher untersuchten wir zuerst das Einwanderungsverhalten der Mikrogliazellen in die Regionen der neuronalen Zellschädigung und konnten eine starke, ortsspezifische Einwanderung in die neuronalen Schichten des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus nach initialer exzitotoxischer Schädigung beobachten (Abb. 9). Antisense-PARP-1-Mikrogliazellen invadierten zwar in das Hirnschnittgewebe, waren aber im Gegensatz zu den Kontroll-Vektor-transfizierten Zellen nicht in der Lage, spezifisch in die neuronalen Degenerationszonen einzuwandern und verteilten sich diffus im gesamten Hirnschnittgewebe (Abb. 9a und 9b). Um Hinweise auf die molekulare Ursache dieser deutlich gestörten Migration zu erhalten, untersuchten wir die Expression aktivierungstypischer Oberflächenmoleküle auf den Mikrogliazellen und fanden eine massiv gestörte Expression des β 2-Integrins CD11a, während die Expression anderer aktivierungsabhängig regulierter Oberflächenmoleküle wie CD11b, CD18 und ICAM-1 unverändert war (Abb. 10a).

Um nun zu untersuchen, ob diese stark verringerte CD11a-Expression in antisense-PARP-1-Mikrogliazellen auch wirklich ursächlich für das gestörte Migrationsverhalten war, klonierten wir einen antisense-CD11a-pcDNA3.1-Vektor, stellten eine stabil transfizierten Mikrogliazelllinie her und wiederholten die Migrationsexperimente: Hierbei zeigte sich, daß auch die antisense-CD11a-Mikrogliazellen im Gegensatz zu Kontroll-Vektor-transfizierten Mikrogliazellen nicht mehr in der Lage waren, spezifisch zum Ort der neuronalen Schädigung zu migrieren und verteilten sich diffus im Hirngewebe (Abb. 10b).

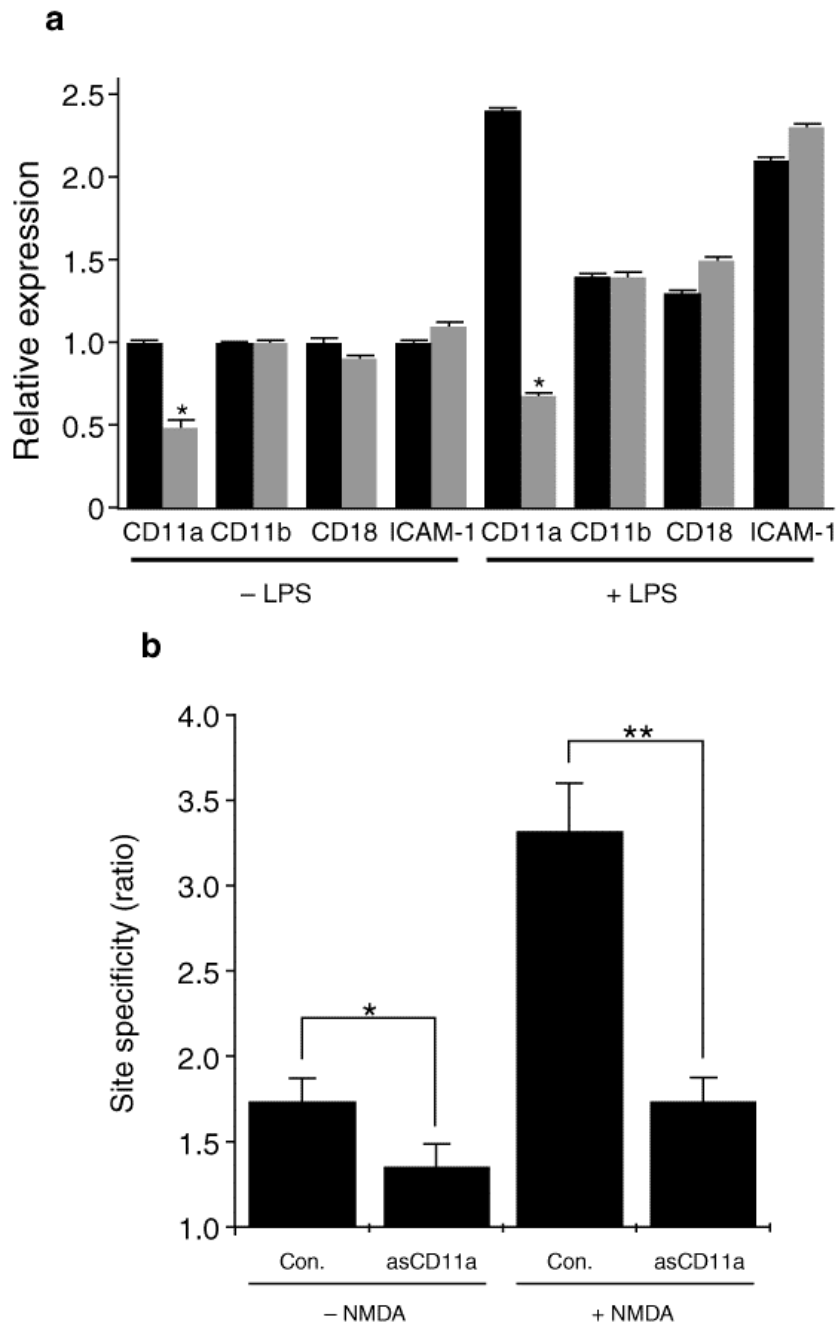


Abb. 10: (aus O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042, 2001): PARP-1 reguliert die CD11a-Expression in aktivierten BV-2-Mikrogliazellen, die notwendig ist für die spezifische Migration zum Ort der neuronalen Schädigung. a: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen in Kontroll-Vektor-transfizierten (schwarze Balken) und antisense-PARP-1-Vektor-transfizierten (graue Balken) BV-2-Mikrogliazellen vor und nach Stimulation mit 10 μ g/ml Lipopolysaccharid (LPS). Mean \pm S.D., n=5, * = p<0,005. b: Ortsspezifität der mikroglialen Migration zum Ort der neuronalen Schädigung von Kontroll-Vektor-transfizierten BV-2-Mikrogliazellen (Con.) und antisense-CD11a-Vektor transfizierten BV-2-Mikrogliazellen (asCD11a) vor und nach Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA (NMDA). Ortsspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dendatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S.D., n=30, * = p<0,05, ** = p < 0,005.

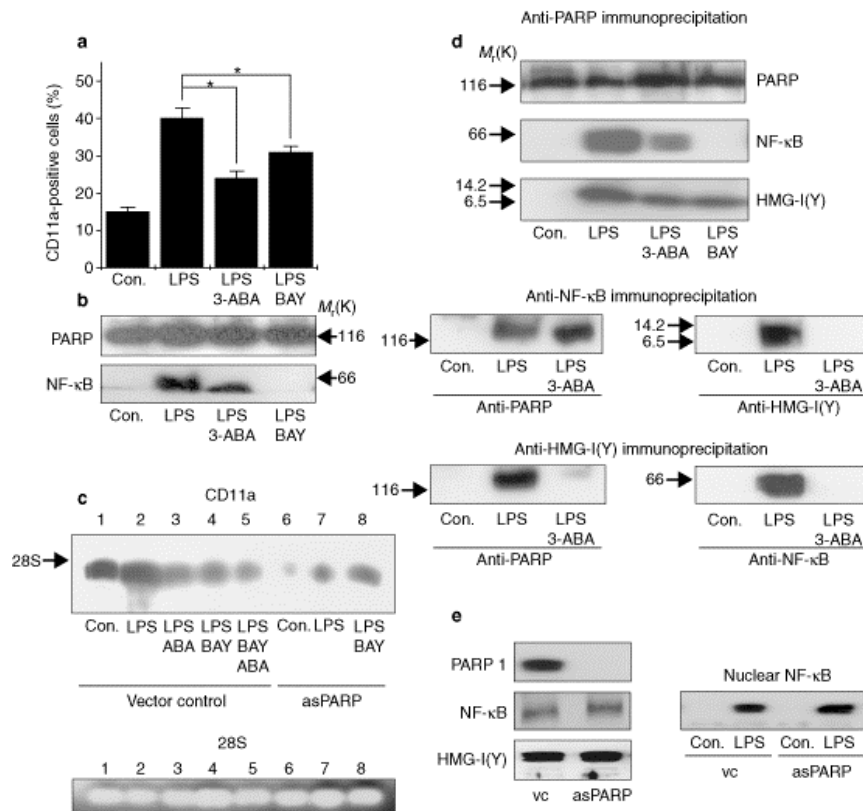


Abb. 11: (aus O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042, 2001): Transkriptionelle Regulation der CD11a-Expression in aktivierten BV-2-Mikrogliazellen durch NF- κ B-Translokation, PARP-1-Aktivierung und Bildung eines PARP-1/NF- κ B/HMG-I(Y)-Komplexes. a: FACS-Analyse der CD11a-Expression Kontroll-Vektor-transfizierter BV-2-Mikrogliazellen mit und ohne Stimulation mit LPS, Hemmung der PARP mit 3-Aminobenzamid (3-ABA) oder der I- κ B-Phosphorylierung mit BAY 11-7085 (BAY). Mean + S.D., n=5, * = p<0,005. b: Immunoblot von Lysaten isolierter Zellkerne gegen PARP-1 und NF- κ B (p65). c: Northern-Blot-Analyse der CD11a-mRNA-Expression in Kontroll-Vektor-transfizierten und mit einem antisense-PARP-1-Vektor transfizierten BV-2-Mikrogliazellen. d: Bildung eines PARP-1/NF- κ B/HMG-I(Y)-Komplexes in aktivierten Mikrogliazellen, Coimmunopräzipitationsexperimente vom Kontroll-Vektor-transfizierten BV-2-Mikrogliazellen mit und ohne Stimulation mit LPS oder Hemmung der PARP mit 3-Aminobenzamid (3-ABA). e: Links: Expression des PARP-, NF- κ B- und HMG-I(Y)-Proteins in Kontroll-Vektor-transfizierten und antisense-PARP-1-Vektor transfizierten BV-2-Mikrogliazellen. Rechts: Nukleäre Translokation von NF- κ B (p65) in Lysaten isolierter Nuklei.

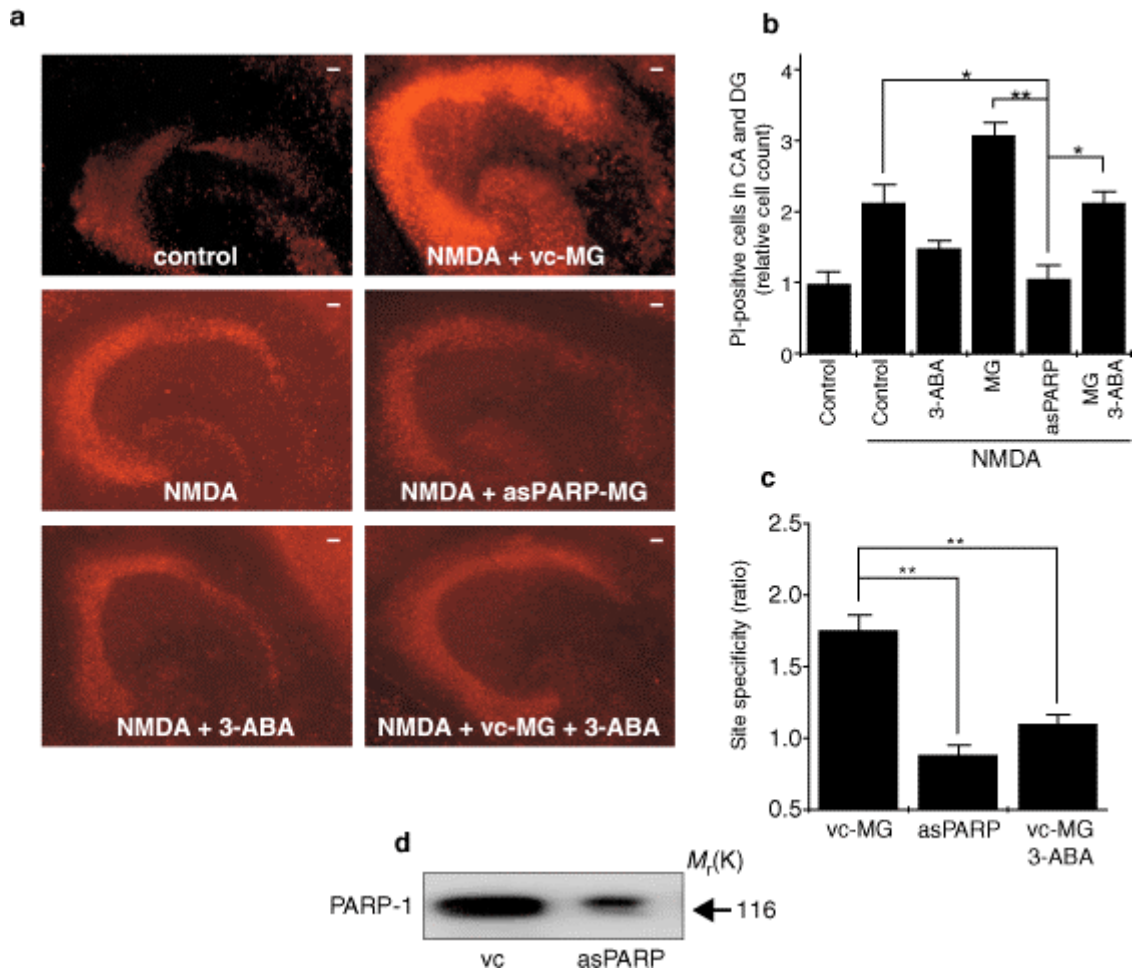


Abb. 12: (aus O. Ullrich et al. Nature Cell Biol. 3, 1035-1042, 2001): Depletion der PARP-1 durch transiente antisense-Transfektion primärer Mikrogliazellen hemmt die Migration zum Ort der neuronalen Schädigung und schützt vor sekundärer Schädigung. a: Propidium-Iodid-Fluoreszenz-Mikroskopie der neuronalen Degenerationszonen in der CA-Region in lebenden OHSCs vor der Fixierung, Skala = 40 μ m. NMDA: Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA; control = ohne Mikrogliazellen, ohne NMDA; 3-ABA = 1 mM 3-Aminobenzamid; vc-MG = mit Kontroll-Vektor-transfizierte primäre Mikrogliazellen, asPARP-MG = mit antisense-PARP-1-Vektor transfizierte primäre Mikrogliazellen. b: Propidium-Iodid-positive tote Zellen in den neuronalen Schichten der Degenerationszone im Cornu ammonis und Gyrus dentatus. Zellzahlen relativ zur Zahl in ungeschädigten OHSCs ohne Zugabe von Mikrogliazellen (control=1). c: Ortsspezifität der mikroglialen Migration zum Ort der neuronalen Schädigung von Kontroll-Vektor-transfizierten primären Mikrogliazellen (vc-MG) und antisense-PARP-1-Vektor transfizierten primären Mikrogliazellen (asPARP) nach Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA. Ortsspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S.D., n=30, * = p<0,05, ** = p < 0,005. d: Residuale PARP-1-Proteinexpression in antisense-PARP-1-Vektor transfizierten primären Mikrogliazellen.

Es konnte also nachgewiesen werden, daß

- die spezifische Ausschaltung der PARP-1 in Mikrogliazellen exzitotoxisch geschädigte Neurone in lebendem Hirngewebe vor sekundärer Schädigung durch die Invasion aktivierter Mikrogliazellen schützt,
- dieser Schutz vor sekundärer neuronaler Schädigung auf einer gestörten Migration der Mikrogliazellen in die neuronale Degenerationszone beruht,
- die Migration von Mikrogliazellen über die Expression des β 2-Integrins CD11a reguliert wird, das transkriptionell über einen Protein-Protein-Komplex aus der poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1, dem translozierten NF- κ B und HMG-I(Y) reguliert wird und
- das durch spezifische Ausschaltung der mikroglialen PARP-1 eine deutlich höhere Neuroprotektion erreicht werden kann als durch Hemmung der PARP-1 im gesamten Hirngewebe.

3 Diskussion und Ausblick

In den vorgestellten Arbeiten konnte ein neuer Mechanismus in Mikrogliazellen identifiziert werden, der einen Signalweg von der PARP-1 im Zellkern bis zur Kontrolle der Migration zum Ort eines neuronalen Schadens repräsentiert. Damit wurde nicht nur ein grundsätzlich neues Regulationsprinzip der Integrin-Expression beschrieben, sondern auch ein molekulares Zielprotein identifiziert, an dem neue therapeutische Strategien zur Neuroprotektion ansetzen könnten. Aufgrund der wesentlichen Beteiligung der PARP-1 sowohl an der Regulation der Mikroglia migration, als auch an der mikroglialen Eigenprotektion gegenüber oxidativen Streß eröffnet die Hemmung der mikroglialen PARP-1 möglicherweise nun therapeutische Optionen bei den neurologischen Erkrankungen, in denen der Mikroglia eine pathologische Funktion zukommt. Diese ist z.B. beim exzitotoxischen Zelltod im Rahmen des Hirninfarkts oder beim M. Alzheimer der Fall. Bei beiden Erkrankungen, obwohl grundsätzlich verschiedener Pathogenese, erscheint die therapeutische Intervention in sekundäre Schadensprozessen sinnvoll, da entweder das Primärereignis bereits irreversibel eingetreten ist (beim Hirninfarkt) bzw. noch überhaupt nicht bekannt ist (M. Alzheimer).

Im Falle des Hirninfarkts ist die Idee einer therapeutischen Intervention mit PARP-1-Inhibitoren nicht neu, nur liegt dieser eine grundsätzlich andere theoretische Annahme zugrunde: Denn dieser von den Arbeitsgruppen Snyder und Dawson (Eliasson et al. 1997; Zhang et al. 1994) und im weiteren von den Firmen Guilford und Pfizer entwickelte und vertretene Ansatz zielt primär auf die Hemmung der neuronalen PARP-1, um die nach exzitotoxischer Schädigung verursachte Überaktivierung der PARP-1 mit einem folgenden massiven NAD^+ - und ATP-Verbrauch, der letztendlich zum Zelltod führt (Ha et al. 2000), zu verhindern. Daher werden PARP-1-Inhibitoren als protektiv gegen den exzitotoxischen Primärschaden bei ischämischen Ereignissen angesehen.

Von den pathobiochemischen Grundlagen her ist dieser Ansatz nicht unproblematisch, denn es ist gut bekannt, daß die PARP-1 wesentlich in die schnelle und effiziente DNA-Reparatur involviert ist (Dantzer et al., 1999) und gerade in Neuronen eine außergewöhnlich hohe Aktivität aufweist (Pieper et al., 2000). Eben diese hohe PARP-1-Aktivität in Neuronen ist aber gerade wahrscheinlich sehr wichtig, um diesen

postmitotischen Zellen wichtige Reparaturvorgänge und ein Überleben unter den Bedingungen einer Zellschädigung, wie sie gerade im Rahmen des akuten Infarktgeschehens oder später durch die Invasion aktivierter Mikroglia entsteht, zu ermöglichen (Colton et al., 1993). Große Mengen dieser aktivierten Mikrogliazellen werden in der sogenannten Penumbra gefunden (Mabuchi et al., 2000), einem Areal initial überlebender Neurone nach einem ischämischen Insult, in dem Stunden bis Tage nach dem Primärereignis weitere Neurone untergehen. Neueste PET-Studien erbrachten deutliche Hinweise auf eine unmittelbar neurodegenerative Wirkung aktivierter Mikroglia in lebenden Patienten (Cagnin et al., 2001).

Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit ein weiteres, von der PARP-1 gesteuertes, protektives System identifiziert werden: Neben der DNA-Reparatur existiert im Zellkern ein schnelles und effizientes proteolytisches System zum Abbau oxidativ geschädigter Histone (Ullrich et al., 1999a; Ullrich et al., 1999b). Die hier präsentierten Arbeiten liefern deutliche Hinweise, daß sowohl die DNA-Reparatur als auch der Abbau geschädigter Histone eine wichtige Voraussetzung zum Erhalt der genomischen Integrität darstellen: Denn unterbleibt der schnelle Abbau geschädigter Histone, kommt es zu einer progredienten Akkumulation von DNA-Schäden, nicht aber zu deren Reparatur (Ciftci and Ullrich et al., 2001b). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Gaziew et al. bereits 1992 eine nukleäre Protease beschrieben haben, die besonders das Histon H1 nur in Anwesenheit von DNA-Schäden abbauen kann (Gaziew et al., 1992). Dieses damals zwar beschriebene, aber nicht aufgeklärte Phänomen lässt sich nun vollständig mit den hier präsentierten Arbeiten erklären: Wir konnten zeigen, daß das Histon H1 sowohl in vitro, als auch in lebenden Zellen in besonderem Maße von dem nukleären 20S Proteasom abgebaut wird, daß über die Interaktion mit der PARP-1 durch DNA-Strangbrüche aktiviert werden kann (Ullrich et al., 1999a; Ullrich et al., 1999b; Ciftci and Ullrich et al., 2001b; Ullrich et al., 2001d).

Die in dieser Schrift vorgestellten Arbeiten beschreiben also zwei völlig neue physiologische Funktionen der PARP-1, die eng mit ihren protektiven Eigenschaften auf Zellebene verbunden sind: Die eine Funktion schützt das Chromatin vor Schäden, die andere Funktion ermöglicht Mikrogliazellen die Exekution ihrer wichtigsten funktionellen Fähigkeit, nämlich die Migration zum Ort des Geschehens. Aber genau diese protektiven und physiologischen Funktionen konvertieren auf Gewebeebene zu einer destruktiven, nämlich wenn entweder gut protektierte Tumorzellen endogenen und exogenen Angriffen (durch Immuneffektorzellen oder durch die Tumorthherapie) so

standhalten können oder invadierende und überaktivierte Mikroglia ungestört ihre schädliche Wirkung im ZNS entfalten kann. In den hier präsentierten Arbeiten konnte gezeigt werden, daß durch Hemmung der PARP in den betroffenen Zellen beides erreicht werden kann: Der Verlust der protektiven Wirkung auf die einzelne Zelle ist mit einem Gewinn für das betroffene Gewebe verbunden: Der Tumorzelltod ist im Sinne des Gesamtorganismus und die gestörte Mikroglia migration ist im Sinne initial überlebender Neurone nach einem exzitotoxischen Insult.

Der entscheidende Punkt dieser therapeutischen Strategien zur Hemmung der PARP-1 ist auch hier die Frage der Zellspezifität. Diese stellt sich im Zusammenhang mit den Hirninfarkt als besonders kritisch dar: Denn während auf der einen Seite durch Hemmung der PARP-1 der akute neuronale Zelltod verhindert werden könnte, könnte auf der anderen Seite durch Hemmung von Reparatursystemen ein weiterer neuronaler Schaden induziert werden. So besteht grundsätzlich die Gefahr, daß die Therapie mit systemischen PARP-1-Inhibitoren nicht zum erwünschten protektiven Erfolg, sondern zu einer weiteren Destruktion funktionsfähigen Hirnparenchyms führen könnte. Dieses ist umsomehr wahrscheinlich, je später mit dieser Therapie nach dem Initialereignis begonnen wird, also je mehr PARP-Inhibitoren mit nun langsam anlaufenden Reparatursystemen überlebender Neurone interferieren. Aus diesen Gründen scheint die bisher verbreitete Strategie der systemischen PARP-Hemmung bei einem Hirninfarkt keineswegs optimal, und es sollte ein viel spezifischeres Vorgehen favorisiert werden:

Da die PARP-1 in phagozytierenden Mikrogliazellen hochgradig erhöht ist (Ullrich et al. 2001b), nicht aber in ruhenden Mikrogliazellen, und zudem auch noch ihre Migration kontrolliert (Ullrich et al., 2001e), könnte ihre Hemmung in Mikrogliazellen sich spezifisch nur für die aktivierten schädlich auswirken. Zudem konnte beobachtet werden, daß nach Invasion von antisense-PARP-1-Mikrogliazellen nicht nur der sekundäre, mikroglial-induzierte neuronale Schaden verhindert werden konnte, sondern es konnte sogar eine Reduktion des neuronalen Schadens unter das Niveau des Primärschadens beobachtet werden (Ullrich et al., 2001e). Dieses könnte auf eine noch vorhandene Produktion, Sekretion und Wirksamkeit protektiver Zytokine aus antisense-PARP-1-Mikrogliazellen zurückzuführen sein. Zwar stellt eine transiente anti-sense-PARP-1-Transfektion von Mikrogliazellen sicher keine brauchbare therapeutische Strategie dar, aber die speziellen Eigenschaften von Mikrogliazellen liefern durchaus ausreichend Ansatzpunkte einer speziell gegen die mikrogliale PARP-1 gerichteten Therapie.

Neueste PARP-Inhibitoren mit einem K_i weit im nanomolaren Bereich, z.B. 2-(4-hydroxyphenyl)-[1H]-benzimidazol-4-carboxamid (NU1085) mit einem K_i von 1,6 nM, bieten nun die Möglichkeit, die Probleme der PARP-Inhibitoren der ersten Generation, wie z.B. die schlechte Löslichkeit, die geringe inhibitorische Potenz mit einem K_i im millimolaren Bereich, die geringe Spezifität und die Interferenz mit anderen ADP-Ribosylierungs-Reaktionen (Zhang et al., 2000), zu überwinden. Verbindet man diese hochpotenten Inhibitoren beispielweise mit einer Vehikel, der nur von phagozytierenden und damit aktivierten Mikrogliazellen aufgenommen wird, wäre der Weg zu einer hochspezifischen Hemmung der PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen denkbar. Sollten die hier für Mikrogliazellen beschriebenen Mechanismen auch für die Makrophagen der Körperperipherie zutreffen, und auch hier die PARP-1 entscheidend an der Regulation der Migration zum Ort der Gewebeschädigung beteiligt sein, worauf es zumindest einige Hinweise gibt (Jijon et al., 2000; Liaudet et al., 2000; Burkart et al., 1993; Oliver et al., 1999), dann könnte die spezifische mikrogliale/makrophagiale PARP-1-Hemmung zur Entwicklung neuer hochpotenter antiinflammatorischer Medikamente führen.

In jedem Falle aber wird zutreffen, was Alexander Bürkle so treffend in seinem neusten Review zur PARP-Forschung beschrieben hat (Bürkle, 2001): "These and many questions will undoubtedly provide sufficient challenge to keep poly(ADP-ribose) researchers excited and busy for quite some more time."

4 Zusammenfassung

Während die zellulären Abwehr- und Reparaturstrategien gegen oxidativ geschädigte DNA bisher gut untersucht waren, gab es bisher noch keine Erkenntnisse über mögliche Schutzmechanismen gegenüber oxidativ geschädigten Histonen, die nach ihrer Schädigung funktionell so entscheidende Prozesse wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur empfindlich stören könnten. Aus diesem Grund konzentrierten sich die Arbeiten zunächst auf die biologischen Konsequenzen und zellulären Abwehrstrategien gegen diese Produkt der oxidativen Zellschädigung, die oxidativ geschädigten Histone. In Untersuchungen zur Regulation des Abbaus oxidativ geschädigter Histone, die durch Reaktion mit inflammatorisch freigesetzten Sauerstoffradikalen wie z.B. Hypochlorit entstehen, konnte gezeigt werden, daß Zellen ein nukleäres proteolytisches System aufweisen, das in der Lage ist, oxidativ geschädigte Kernproteine, auch in Bindung an die DNA, selektiv zu erkennen und spezifisch abzubauen. Dieses System wurde als das 20S Proteasom identifiziert. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, daß das bisherige Konzept der Stabilität und des sehr langsamen endogenen Turnovers der Histonproteine nur für den wenig physiologischen Fall einer oxidativ völlig unbelasteten Zelle gilt und daß schon geringgradiger oxidativer Stress zu einem deutlich gesteigerten Histonturnover führt. Dabei scheint dem Turnover von Histon H1 eine Sonderfunktion zuzukommen. Das nukleäre 20S Proteasom wird im Zellkern wesentlich durch hochaffine Bindung von ADP-Ribose-Polymeren aus der automodifizierten Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) reguliert. Damit erwies sich die PARP-1 als ein mögliches wichtiges Signalmolekül zur Umsetzung eines zellulären Schadens in eine protektive Antwort. Darüberhinaus konnte das durch Lipidperoxidation endogen entstehende 4-Hydroxynonenal als ein starker endogener Inhibitor und damit negativer Regulator der PARP-1 während oxidativer Belastung identifiziert werden und sein intrazellulärer Metabolismus aufgeklärt werden.

Es stellte sich die Frage, inwieweit dieses protektive PARP-1-abhängige System nun an zellulären Resistenzmechanismen gegen die erwünschte oxidative Schädigung von Tumorzellen unter chemotherapeutischer Behandlung beteiligt ist und ob die Ausschaltung dieses Systems mittels chemischer Hemmung oder mittels antisense-Technik zu einer erhöhten Effektivität einer Antitumorthérapie beitragen kann. Es konnte festgestellt werden, daß die Aktivierung des nukleären Proteasoms nach oxidativer Belastung vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängig ist und diese

Proteasomaktivierung auch in proliferierenden und retrodifferenzierten humanen Leukämiezellen auf der nicht-kovalenten Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten der automodifizierten PARP-1 beruht. Die PARP-1-regulierte Proteasomaktivierung schützt also oxidativ belastete proliferierende humane Leukämiezellen vor der Akkumulation oxidativ geschädigter Proteine. Bei Behandlung mit Adriamycin konnte ebenfalls eine vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängige PARP-1-regulierte Aktivierung des nukleären Proteasoms beobachtet werden, die der Entstehung von DNA-Protein-Crosslinks und weiteren Akkumulation von DNA-Strangbrüchen entgegenwirkt. Diese PARP-1-regulierte Proteasomaktivierung war auch in leukämischen Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nachweisbar und konnte nach Ausschaltung durch antisense-Technik oder nach chemischer Hemmung die Empfindlichkeit von humanen Leukämiezellen gegenüber Adriamycin deutlich erhöhen.

Nach Identifikation der PARP-1 als wichtiges Signalmolekül für protektive Reaktionen nach oxidativer Schädigung von Tumorzellen lag es nahe, phagozytotisch aktive Immunzellen sowohl in der Körperperipherie als auch im ZNS zu untersuchen, da diese gerade unter entzündlichen Bedingungen eine große Menge an Sauerstoffradikalen freisetzen, deren toxische Wirkung sie aber selbst überleben. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß in aktivierten Mikrogliazellen diese PARP-1-abhängige Aktivierung des nukleären Proteasoms einen wesentlichen antioxidativen Schutzmechanismus darstellt, der die Akkumulation von oxidativ geschädigten Proteinen und den dadurch induzierten Zelltod verhindern kann. Darüberhinaus konnte ein weiterer intrazellulärer Mechanismus identifiziert werden, der an der spezifischen Migration aktivierter Mikrogliazellen zum Ort der neuronalen Schädigung wesentlich beteiligt ist. Wir identifizierten die Expression des β 2-Integrins CD11a an der Oberfläche von aktivierten Mikrogliazellen als notwendige Voraussetzung zur Migration zum Ort der neuronalen Schädigung und fanden eine intrazelluläre Regulation der CD11a-Expression auf Transkriptionsebene durch Bildung eines Protein-Protein-Komplexes aus der automodifizierten PARP-1, dem nukleär transloziertem NF- κ B und HMG-I(Y). Die funktionelle Bedeutung dieses Mechanismus konnte durch transiente Transfektion von primären Mikrogliazellen mit den entsprechenden antisense-Konstrukten belegt werden. Die Transfektion von Mikrogliazellen mit einem antisense-PARP-Vektor führte zur kompletten Aufhebung der Migration in das Gebiet des neuronalen Primärschadens und zu einer kompletten Vermeidung des mikroglial induzierten neuronalen Sekundärschadens. Daher könnte

die spezifische Hemmung der PARP-1 in Mikrogliazellen eine mögliche neue therapeutische Strategie zur Entwicklung hochpotenter antiinflammatorischer Medikamente zum Zwecke der Neuroprotektion darstellen.

5 Literaturverzeichnis

- Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Tooyama I, Ishii T and McGeer PL. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer's disease and some other degenerative neurological disorders. *Acta Neuropathol. Berl.* 85, 628-634 (1993)
- Albrich JM, McCarthy CA and Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 210-214 (1981)
- Altman SA, Zastawny L, Cacciuttolo MA, Akman SA, Dizdaroglu M and Rao G. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 897-902 (1995)
- Alvarez-Gonzalez R, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents *Mutat. Res.* 218, 67-74 (1989)
- Ame JC, Rolli V, Schreiber V, et al. PARP-2: A novel mammalian DNA-damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 274, 17860-17868 (1999)
- Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. PARP-2, a novel mammalian DNA-damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase *J. Biol. Chem.* 274, 17860-17868 (1999)
- Arribas J and Castano JG. Kinetic studies of the differential effect of detergents on the peptidase activities of the multicatalytic proteinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265, 13969-13973 (1990)
- Babiychuk E, Cottrill PB, Storozhenko S, Fuangthong M, Chen Y, O'Farrell MK, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S. Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases *Plant J.* 15, 635-645 (1998)

- Bechmann I and Nitsch R. astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20, 145-154 (1997)
- Berger NA, Berger SJ, Gerson SL. DNA repair, ADP-ribosylation and pyridine nucleotide metabolism as targets for cancer chemotherapy. *Anticancer Drug Des.* 2, 203-209 (1987)
- Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage *Radiat. Res.* 101, 4-15 (1985)
- Berghammer H, Ebner M, Marksteiner R, Auer B pADPRT-2: A novel mammalian polymerizing(ADP-ribosyl)transferase gene related to truncated pADPRT homologues in plants and *Caenorhabditis elegans* *FEBS Lett.* 449 259-263 (1999)
- Berry DM, Williams K, Meckling-Gill KA. All-trans-retinoic acid induces apoptosis in acute promyelocytic NB4 cells when combined with isoquinolinediol, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Leuk. Res.* 24, 307-316 (2000)
- Bhatia M, Kirkland JB and Meckling-Gill KA: Overexpression of poly(ADP-ribose)polymerase promotes cell cycle arrest and inhibits neutrophilic differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Growth Differ.* 7, 91-100 (1996)
- Bielinska A, Kukowska-Latallo JF, Johnson J, Tomalia DA and Baker JR. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acid. Res.* 24, 2176-2182 (1996)
- Bielinska A, Kukowska-Latallo JF and Baker JR. The interaction of plasmid DNA mit polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 180-190 (1997)
- Boulikas T. Poly(ADP-ribosyl)ation, DNA strand breaks, chromatin and cancer. *Toxicol Lett.* 67, 129-150 (1993)

- Bowes J, Piper J, Thiernemann C. Inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase reduce the cell death caused by hydrogen peroxide in human cardiac myoblasts *Br. J. Pharmacol.* *124*, 1760-1766 (1998)
- Bowman KJ, Newell DR, Calvert AH, Curtin NJ. Differential effects of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br. J. Cancer* *84*, 106-112 (2001)
- Burkart V, Kolb H. Protection of islet cells from inflammatory cell death in vitro *Clin. Exp. Immunol.* *93* 273-278 (1993)
- Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF, Kolb H. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin *Nature Med.* *5*, 314-319 (1999)
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE. In vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* *358*, 461-467 (2001)
- Cantoni O, Cattabeni F, Stocchi V, Meyn RE, Cerutti P and Murray D. Hydrogen peroxide insult in cultured mammalian cells: relationships between DNA single-strand breakage, poly(ADP-ribose) metabolism and cell killing. *Biochem. Biophys. Acta* *1014*, 1-7 (1989)
- Cervantes-Laurean D, Jacobson EL and Jacobson MK. Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* *271*, 10461-10469 (1996)
- Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *11*, 39-43 (1963)
- Chambon P, Doly JD, Strosser MT and Mandel P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *25*, 638-643 (1966).
- Champlin R, Gale RP. Acute myelogenous leukemia: recent advances in therapy. *Blood* *69*, 1551-1562 (1987)

- Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zouaoui D, Represa A, Ben-Ari Y. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. *Trends Neurosci.* 19, 109-114 (1996)
- Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADP-ribose) polymerase: A guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. *Mol. Cell. Biochem.* 193, 23-30 (1999)
- Chatterjee S, Cheng MF, Berger RB, Berger SJ, Berger NA. Effect of inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase on the induction of GRP78 and subsequent development of resistance to etoposide. *Cancer Res.* 55, 868-873 (1995)
- Chi NW, Lodish HF. Tankyase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 38437-38444 (2000)
- Colton CA. and Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223, 284-288 (1987)
- Cosi C, Colpaert F, Koek W, Degryse A, Marien M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice. *Brain Res.* 729, 264-269 (1996)
- Cosi C, Suzuki H, Milani D, Facci L, Menegazzi M, Vantini G, Kanai Y, Skaper SD. Poly(ADP-ribose) polymerase: Early involvement in glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells *J. Neurosci. Res.* 39, 38-46 (1994)
- Cottet F, Blanché H, Verasdonck P, Le Gall I, Schächter F, Bürkle A et al. New polymorphisms in the human poly(ADP-ribose) polymerase-1-oding sequence: lack of association with longevity or with increased cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity. *J. Mol. Med.* 78, 431-440 (2000)
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structur and functions of the 20S and the 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801-847 (1996)
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 342, 249-268 (1999)

- Davies KJA, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria, I: anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem.* 261, 3060-3067 (1986)
- Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9920 (1987)
- de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation *J. Biol. Chem.* 261, 7011-7017 (1986)
- de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: A molecular nick-sensor *Trends Biochem. Sci.* 19, 172-176 (1994)
- de Murcia J. M., Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7303-7307 (1997)
- DeMurcia G, Shall S. Poly (ADP-Ribosylation) Reactions. From DNA damage and stress signalling to cell death. Oxford University Press, 2000
- Doroshov JH, Davies KJA. Redox cycling of anthracyclins by cardiac mitochondria: II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* 261, 3068-3074 (1986)
- Ducrocq S, Benjelloun N, Plotkine M, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlange C. Poly(ADP-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *J. Neurochem.* 74, 2504-2511 (2000)
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis *Cancer Res.* 57, 1835-1840 (1997)
- Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage *J. Neurosci.* 19, 5910-5918 (1999)

- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia *Nature Med.* 3, 1089-1095 (1997)
- Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 1143-1151 (1997)
- Enright HU, Miller WJ, Hebbel RP. Nucleosomal histone proteins protects DNA from iron-mediated damage. *Nucleic Acid Res.* 20, 3341-3346 (1992)
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81-128 (1991)
- Feinstein E, Canaani E, Weiner LM. Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32, 13156-13161 (1993)
- Folch E, Salas A, Prats N, Panes J, Pique JM, Gelpi E et al. H₂O₂ and PARS mediate lung P-selectin upregulation in acute pancreatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1286-1294 (2000)
- Fougerousse F, Meloni R, Roudaut C, Beckmann JS. Dinucleotide repeat polymorphism at the human poly(ADP-ribose) polymerase gene (PPOL). *Nucleic Acid Res.* 20, 1166 (1992)
- Frechette A, Huletsky A, Aubin RJ, de Murcia G, Mandel P, Lord A, Grondin G, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation of chromatin: Kinetics of relaxation and its effect on chromatin solubility *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63, 764-773 (1985)
- Gale EA. Theory and practice of nicotinamide trials in pre-type 1 diabetes *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 9, 375-379 (1996b)
- Gaziew AI, Kutsyi MP. Gamma-irradiated DNA activates histone H1-specific proteinase of rat liver nuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 169-174 (1992)
- Goria-Gatti L, Iannone A, Tomasi A, Poli G and Albano E. In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: a spin-trapping

- study. *Carcinogenesis* 13, 799-805 (1992)
- Grube K, Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-species life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11759-11763 (1992)
- Grune T, Siems WG, Kowalewski J, Zollner H, Esterbauer H. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine. *Biochem. Int.* 25, 963-971 (1991)
- Grune T, Siems WG, Zollner H, Esterbauer H. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in Ehrlich mouse ascites cells at different proliferation stages. *Cancer Res.* 54, 5231-5235 (1992)
- Grune T, Blasig IE, Sitte N, Roloff E, Haseloff R and Davies KJA. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 10857-10862 (1998)
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Protein degradation in cultured liver epithelial cells during oxidative stress: role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 2344-2351 (1995)
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 271, 15504-15509 (1996)
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11, 526-534 (1997)
- Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJA. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress - Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 2344-2351 (1995)
- Gunjan A, Alexander BT, Sittman DB, Brown DT. Effects of histone H1 variant overexpression on chromatin structure. *J. Biol. Chem.* 274, 37950-37956 (1999)
- Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13978-13982 (1999)

- Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol. Dis.* 7, 225-239 (2000)
- Hailer NP, Jarhult JD and Nitsch R. Resting microglia cell in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18, 319-331 (1996)
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S and Nitsch R. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus* 7, 341-349 (1997)
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R. Fluorescent dye pre-labelled microglial cells migrate into hippocampal slice cultures and ramify. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3284-3290 (1997)
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R. Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 8, 459-474 (1998)
- Hara S, Halicka HD, Bruno S, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 223, 372-384 (1996)
- Hass R and Lopez-Guerrero J. Aggressive tumor growth of the human TUR leukemic cells is associated with high levels of c-myc expression and down-regulation of p20-max. *Int. J. Cancer* 72, 1113-1116 (1997)
- Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Köhler L, Goppelt-Strübe M and Resch K, TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of surface antigens. *Eur. J. Cell Biol.* 48, 282-293 (1989)
- Hass R, Gunji H, Datta R, Kharbanda S, Hartmann A, Weichselbaum R and Kufe D. Differentiation and retrodifferentiation of human myeloid leukemia cells is associated with reversible induction of cell cycle regulation genes. *Cancer Res.* 52, 1445-1450 (1992)

- Hass R, Hirano M, Kharbanda S, Rubin E, Meinhardt G and Kufe D. Resistance to phorbol-ester-induced differentiation of a U937 myeloid leukemia cell variant with a signaling defect upstream to Raf-1 kinase. *Cell Growth Differ.* 4, 657-663 (1993)
- Hatakeyama K, Nemoto Y, Ueda K, Hayaishi O. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase: Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose) *J. Biol. Chem.* 261, 14902-14911 (1986)
- Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* 99, 2075-2081 (1997)
- Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Burkle A, Fehsel K, Burkart V, Kolb H. Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells *J. Biol. Chem.* 270, 11176-11180 (1995)
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D and Nitsch R. Activated microglial cells migrate towards the sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3284-3290 (1998)
- Herceg Z, Wang ZQ. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis *Mol. Cell. Biol.* 19, 5124-5133 (1999)
- Hirugashi M, Adachi H, Ohba Y. Synthesis and degradation of H1 histone subtypes in mouse lymphoma L5178Y cells. *J. Biol. Chem.* 262, 13075-13080 (1987)
- Hu S, Sheng WS, Peterson PK and Chao CC. Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia* 13, 45-50 (1995)
- Jacobson MK, Jacobson EL. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem. Sci.* 24, 415-417 (1999)
- Jacobson MK, Althaus F et al. 13th International Symposium on ADP-ribosylation Reactions, June 8-11, 2001, New York, New York USA, www.adpr2001.org/goals.htm

- Jeggo PA. DNA repair: PARP - another guardian angel ? *Curr. Biol.* 8, R49-R51 (1998)
- Jentoft N and Dearborn DG. Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride. *J. Biol. Chem.* 254, 4359-4365 (1979)
- Jijon HB, Churchill T, Malfair D, Wessler A, Jewell LD, Parsons HG et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G641-651 (2000)
- Johansson M. A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* 57 442-445 (1999)
- Jones NJ, Ellard S, Waters R and Parry EM. Cellular and chromosomal hypersensitivity to DNA crosslinking agents and topoisomerase inhibitors in the radiosensitive Chinese hamster irs mutants: phenotypic similarities to ataxia teleangiectasia and Fanconi's anaemia cells. *Carcinogenesis* 14, 2487-2494 (1993)
- Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T et al. Evidence for regulation of NF- κ B by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. J.* 346, 641-649 (2000)
- Kato T, Suzumura Y, Fukushima M. Enhancement of bleomycin activity by 3-aminobenzamide, a poly(ADP-ribose) synthesis inhibitor, in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 8, 239-243 (1988)
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985 (1993)
- Kawamura T, Hanai S, Yokota T, Hayashi T, Poltronieri P, Miwa M, Uchida K. An alternative form of poly(ADP-ribose) polymerase in *Drosophila melanogaster* and its ectopic expression in rat-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 35-40 (1998)

- Khan AU and Kasha M. Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: Application to studies on the deleterious health effects of chlorinated drinking water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12362-12364 (1994)
- Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase *J. Cell Biol.* 146 917-928 (1999)
- Kim JW, Kim K, Knag K, Joe CO. Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 8121-8125 (2000)
- Kirsten E, Bauer PI and Kun E. Cellular regulation of ADP-ribosylation of proteins. IV. Conversion of poly(ADP-ribose)polymerase activity to NAD-glycohydrolase during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells. *Exp. Cell. Res.* 194, 1-8 (1991)
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318 (1996)
- Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 45, 357-360 (1995)
- Krupitza G, Cerutti P. ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6. *Biochemistry* 28, 2034-2040 (1989a)
- Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: From equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.* 26, 641-655 (1992)
- Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S and Ichihara A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7071-7075 (1990)
- Lautier D, Lagueux J, Thibodeau J, Menard L, Poirier GG. Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism *Mol. Cell. Biochem.* 122, 171-193 (1993)

- Lee SC, Liu W, Roth P, Dickson DW, Berman JW and Brosnan CF. Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *J. Immunol.* 150, 594-604 (1993)
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis *J. Exp. Med.* 185, 1481-1486 (1997a)
- Leist M, Single B, Kühnle G, Volbracht C, Hentze H, Nicotera P. Apoptosis in the absence of poly-(ADP-ribose) polymerase *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 518-522 (1997b)
- Liaudet L, Szabo A, Soriano FG, Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Poly (ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. *Shock* 14, 134-141 (2000)
- Lindenau J, Noack H, Asayama K and Wolf G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24, 252-256 (1998)
- Liu J, Ying W, Massa S, Duriez PJ, Swanson RA, Poirier GG et al. Effects of transient global ischemia and kainate on poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) gene expression and proteolytic cleavage in gerbil and rat brains. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 80, 7-16 (2000)
- Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease *Brain* 122, 247-253 (1999a)
- Love S, Barber R, Wilcock GK. Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 98-103 (1999b)
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9730-9734 (1993)

- Ludwig A, Behnke B, Holtlund J, Hilz H. Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates: An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 263, 6993-6999 (1988)
- Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schutz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 287, 2486-2492 (2000)
- Mabuchi T et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31, 1735-1743 (2000)
- Mahajan PB, Zuo Z. Purification and cDNA cloning of maize Poly(ADP)-ribose polymerase. *Plant Physiol.* 118, 895-905 (1998)
- Mandir AS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Wang ZQ, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Hoffman BE, Guastella DB, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5774-5779 (1999)
- Mandir AS, Poitras MF, Berliner AR, Herring WJ, Guastella DB, Feldman A et al. NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Neurosci.* 20, 8005-8511 (2000)
- Marcillat O, Zhang Y, Davies KJA. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochem J.* 259, 181-189 (1989)
- Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2301-2304 (1999)
- Masutani M, Nazaki T, Nakmoto K, Nakagama H, Suzuki H, Kusuoka O et al. The response of PARP knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat. Res.* 462, 159-166 (2000)

- McConkey DJ. Calcium-dependent, interleukin-1-converting enzyme inhibitor-insensitive degradation of laminin B1 and DNA fragmentation in isolated thymocyte nuclei. *J. Biol. Chem.* 271, 22398-22406 (1996)
- Mellgren RL. Proteolysis of nuclear proteins by μ -calpain and m-calpain. *J. Biol. Chem.* 266, 133920-13924 (1991)
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzales R. Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction in intermolecular. *J. Biol. Chem.* 268, 22575-22580 (1993)
- Messmer UK, Lapetina EG and Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol. Pharmacol.* 47, 757-765 (1995)
- Meyer R, Müller M, Beneke S, Küpper JH, Bürkle A. Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *Int. J. Cancer* 88, 351-355 (2000)
- Minaga T and Kun E. Spectral analysis of the conformation of polyadenosine diphosphoribose. Evidence indicating secondary structure. *J. Biol. Chem.* 258, 725-730 (1983)
- Miwa M, Sugimura T. Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract *J. Biol. Chem.* 246, 6362-6364 (1971)
- Miwa M, Ishihara M, Takishima S, Takasuka N, Maeda M, Yamaizumi Z, Sugimura T, Yokoyama S and Miyazawa T. The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage. *J. Biol. Chem.* 256, 2916-2921 (1981)
- Muiras ML, Bürkle A. Defending genome integrity over life span: A proposed role for PARP-1. *Exp. Gerontol.* 35, 703-709 (2000)
- Nagao M, Nakayasu M, Aonuma S, Shima H, Sugimura T. Loss of amplified genes by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Environ Health Perspect.* 93, 169-174 (1991)

- Nagayama T, Simon RP, Chen D, Henshall DC, Pei W, Stetler RA et al. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J. Neurochem.* 74, 1636-1645 (2000)
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K and Wolf G. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitrenergic stress. *Glia* 23, 285-297 (1998).
- Niedergang CP, de Murcia G, Ittel ME, Pouyet J, Mandel P. Time course of polynucleosome relaxation and ADP-ribosylation: Correlation between relaxation and histone H1 hyper-ADP-ribosylation *Eur. J. Biochem.* 146, 185-191 (1985)
- Odaka C, Mizuochi T. Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *J. Immunol.* 163, 5346-5352 (1999)
- Oliver F, Menissier-de-Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice *EMBO J.* 18, 4446-4454 (1999)
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501 (1991)
- Perry VH, Matyszak MK and Fearn S. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia* 7, 60-67 (1993)
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3059-3064 (1999a)
- Pieper AA, Walles T, Wei G, Clements EE, Verma A, Snyder SH, Zweier J. (2000) Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption *Mol. Med.* 6(4), 271-82 (2000)

- Plaschke K, Kopitz J, Weigand MA, Martin E, Bardenheuer HJ. The neuroprotective effect of cerebral poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in a rat model of global ischemia. *Neurosci. Lett.* 284, 109-112 (2000)
- Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 40974-40980 (2000)
- Plummer SM and Faux SP. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and HeLa cells exposed to fecapentaene-12: evidence for the involvement of prostaglandin H synthetase and iron. *Carcinogenesis* 15, 449-453 (1994)
- Preisler HD, Anderson K, Rai K, et al. The frequency of long-term remission in patients with acute myelogenous leukemia treated with conventional maintenance chemotherapy: a study of 760 patients with a minimal follow-up time of 6 years. *Br J Haematol.* 71, 189-194 (1989)
- Quesada P, Atorino L, Cardone A, Ciarcia G and Farina B. Poly(ADP-ribosyl)ation system in rat germinal cells at different stages of differentiation. *Exp. Cell. Res.* 226, 183-190 (1996)
- Realini CA and Althaus FR. Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.* 267, 18858-18865 (1992)
- Reinheckel T, Ullrich O, Sitte N and Grune T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 65-68 (2000)
- Rovera G, O'Brian TA and Diamond L. Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* 204, 868-870 (1979)
- Ruf A, de Murcia G, Schulz GE. Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* 37, 3893-3900 (1998)
- Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG. Characterization of sPARP-1 *J. Biol. Chem.* 275, 15504-15511 (2000)

- Sato MS and Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* (London) 356, 356-358 (1992)
- Schubert P and Rudolphi K. Interfering with the pathologic activation of microglial cells and astrocytes in dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12, *Suppl.* 2, S21-S28 (1998)
- Selle A, Ullrich O, Hass R. Retrodifferentiation of human leukemic cells is mediated by poly-ADP-ribose-polymerase. 5th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Weimar, Germany (2001)
- Selley ML, Bourne DJ, Bartlett MR, Tymms KE, Brook AS, Duffield AM, Ardlie NG. Occurrence of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 481-484 (1992)
- Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model ? *Mutat. Res.* 460, 1-15 (2000)
- She ZW, Wewers MD, Herzyk DJ and Davies WB. Tumor necrosis factor increases the elastolytic potential of adherent neutrophils: A role for hypochlorous acid. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9, 386-392 (1993)
- Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK et al. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.* 273, 30069-30072 (1998)
- Siems WG, Zollner H, Esterbauer H. Metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine. *Biochem. Int.* 25, 963-971 (1991)
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H and Smulson ME. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol. Cell. Biochem.* 193, 137-148 (1999)
- Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DS, Konopka G, Luo R, Wang ZQ et al. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11274-11279 (2000)

- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Li JH, Zhang J, Smulson ME. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity is insufficient to induce tetraploidy. *Nucleic Acids Res.* 29, 841-849 (2001)
- Sinha BK and Mimnaugh EG. Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Radical Biol. Med.* 8, 567-581 (1990)
- Sinha BK, Mimnaugh EG. Free radicals and anticancer drug resistance; oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Radic Biol Med.* 8, 567-581 (1990)
- Smith S, Gariat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres *Science* 282, 1484-1487 (1998)
- Smith S, de Lange T. Tankryase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* 10, 129-302 (2000)
- Smith S. The world according to PARP. *Trends Biochem. Sci.* 26, 174-179 (2001)
- Soldatenkov VA, Albor A, Patel BK, Dreszer R, Dritschilo A, Notario V. Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promotor by the ETS transcription factor. *Oncogene* 18, 3954-3962 (1999)
- Stohwasser R, Giesebrecht J, Kraft R, Muller EC, Hausler KG, Kettenmann H, Hanisch UK and Kloetzel PM. Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia* 29, 355-365 (2000)
- Stoll G, Jander S and Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56, 149-171 (1998)
- Strosznajder JB, Jesko H, Strosznajder RP. Age-related alteration of poly(ADP-ribose) polymerase activity in different parts of the brain. *Acta Biochim. Pol.* 47, 331-337 (2000)
- Sugaya K, Chouinard M and McKinney M. Immunostimulation protects microglial cells from nitric oxide-mediated apoptosis. *Neuroreport* 8, 2241-2245 (1997)

- Szabo C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, Salzman AL, Perretti M. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects J. Exp. Med. 186, 1041-1049 (1997)
- Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite Circ. Res. 78, 1051-1063 (1996)
- Takahashi K, Pieper AA, Croul SE, Zhang J, Snyder SH, Greenberg JH. Post-treatment with an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates cerebral damage in focal ischemia Brain Res. 829, 46-54 (1999)
- Tentori L, Lacal PM, Benincasa E, et al. Role of wild-type p53 on the antineoplastic activity of temozolomide alone or combined with inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. J Pharmacol Exp Ther. 285, 884-893 (1998)
- Test ST and Weiss SJ. The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. Adv. Free Radical Biol. Med. 2, 91-116 (1986)
- Thomas JO. Histone H1: location and role. Curr. Opin. Cell. Biol. 11, 312-317 (1999)
- Tomoda T, Kurashige T and Taniguchi T. Inhibition of interferon-gamma- and phorbol-ester-induced HLA-DR and interleukin-1 production by the expression of a transfected poly(ADP-ribose) synthetase gene in human leukemia THP-1 cells. Biochem. Biophys. Acta 1135, 79-83 (1992)
- Toyokuni S, Okamoto K and Yodoi J. Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett. 358, 1-3 (1995)
- Tsvetkov S, Ivanova E, Djondjurov L. Metabolic behaviors of the core histones in proliferating Friend cells. Exp. Cell Res. 180, 94-105 (1989)
- Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujichi T, Nakagama H et al. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. Carcinogenesis 22, 1-3 (2001)

- Urade M, Sugi M and Miyazaki T. Establishment of three bleomycin-resistant human carcinoma cell lines and their cross-resistance to other antitumor agents. *Cancer* 61, 1501-1507 (1988)
- Ursini MV, Parrella A, Rosa G, Salzano S and Martini G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.* 323, 801-806 (1997)
- Voelkel-Johnson C, Entingh AJ, Wold WS, Gooding LR, Laster SM. Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J. Immunol.* 154, 1707-1716 (1995)
- Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart: Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 271, 29223-29230 (1996)
- Waterborg JH. Histone synthesis and turnover in alfalfa. *J. Biol. Chem.* 268, 4912-4917 (1993)
- Watson CY, Whish WJ, Threadgill MD. Synthesis of 3-substituted benzamides and 5-substituted isoquinolin-1(2H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bioorg Med Chem.* 6, 721-734 (1998)
- Weiss SJ and LoBuglio AF. Biology of disease. Phagocyte generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Inv.* 47, 5-18 (1982)
- Wielckens K, Schmidt A, George B, Bredehorst R and Hilz H. DNA fragmentation and NAD depletion. Their relation to the turnover of endogenous mono(ADP-ribosyl) and poly(ADP-ribosyl) proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 12872-12877 (1982)
- Wolffe AP. Histone H1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1463-1466 (1997)
- Wondrak GT, Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK. Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 351, 769-777 (2000)
- Yakovlev AG, Wang G, Stoica BA, Boulares HA, Spoonde AY, Yoshihara K et al. A role of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 275, 21302-21308 (2000)

- Yan SD, Chen Y, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern P and Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685-691 (1996)
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263, 687-689 (1994)
- Zhang J, Pieper A, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) synthetase activation: An early indicator of neurotoxic DNA damage *J. Neurochem.* 65, 1411-1414 (1995)
- Zhang J, Lautar S, Hunag S, Ramsey C, Cheung A, Li JH. GPI 6150 prevents H₂O₂ cytotoxicity by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 590-598 (2000)
- Zielasik J, Archelos JJ, Toyka KV and Hartung HP. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat microglial cells. *Neurosci. Lett.* 153, 136-139 (1993)
- Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengeller Z, Salzman AL, Szabo C. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase *Cardiovasc. Res.* 36, 205-215 (1997)
- Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 83, 85-94 (1998)
- Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Blockade of poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis *Gastroenterology* 116, 335-345 (1999)

Zitierte eigene Arbeiten

- O.Ullrich, T.Grune, W.Henke, H.Esterbauer, W.G.Siems. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* 352, 84-86 (1994)
- O.Ullrich, T.Grune, W.Henke, H.Esterbauer, W.G.Siems. The effect of the cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and its metabolite 4-hydroxynonenoic acid on respiration of isolated rat kidney cortex mitochondria. *Free Radical Res.* 24(6), 421-427 (1996)
- O.Ullrich, T.Grune, K.Lehmann, H.Huser, W.Ehrlich, W.G.Siems. Inhibition of the poly(ADP-ribose) formation by 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 315(3), 705-708 (1996)
- O.Ullrich, H.Huser, W.Ehrlich, T.Grune. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Free Radical Biol. Med.* 22(7), 1153-1157 (1997a)
- O.Ullrich, T.Grune. Detection of 8-hydroxy-deoxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high performance capillary electrophoresis. *J. Chrom. B* 697, 243-249 (1997b)
- O.Sommerburg, O.Ullrich, N.Sitte, W.Siems, T.Grune. Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light - Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 24(9), 1369-1374 (1998a)
- T.Reinheckel, N.Sitte, O.Ullrich, U.Kuckelkorn, K.J.A.Davies, T.Grune. Resistance of the 20S proteasome to oxidative stress - comparison of the activities of the 20S and 26S proteasome. *Biochem. J.* 335, 637-642 (1998b)
- O.Ullrich, N.Sitte, O.Sommerburg, V.Sandig, T.Grune. Influence of DNA binding on the degradation of oxidized histones by the 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 362(2), 21-216 (1999a)

- O.Ullrich, T.Reinheckel, N.Sitte, R.Hass, T.Grune. Poly-ADP-ribose-polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6223-6228 (1999b)
- P. Meyer-Kuckuk, O.Ullrich, T.Grune, M. Ziegler, M.Schweiger. Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 259, 576-581 (1999c)
- O.Ullrich, T.Reinheckel, N.Sitte, T.Grune. Degradation of hypochlorite damaged glucose-6-phosphate dehydrogenase by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 27, 487-492 (1999d)
- T.Reinheckel, O.Ullrich, N.Sitte, T.Grune. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 377(1), 65-68, (2000a)
- O.Ullrich, Ö.Ciftci, R.Hass. Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase in human myelomonocytic cells after oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 29(10), 995-1004 (2000b)
- J.Mehlhase, J.Gieche, O.Ullrich, N.Sitte, T.Grune. LPS-induced protein oxidation and proteolysis in BV-2 microglial cells. *IUBMB Life* 50(4-5), 331-335 (2000c)
- P.Lasch, T.Petras, O.Ullrich, J.Backmann, D.Naumann, T.Grune. Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A *J. Biol. Chem.* 276, 9492-9502 (2001a)
- Ö.Ciftci, O.Ullrich*, C.A.Schmidt, A.Diestel, R.Hass. Regulation of the nuclear proteasome activity in human leukemia cells after adriamycin-treatment. *Blood* 97(9), 2830-2838 (2001b)
- O.Ullrich, A.Diestel, I.Bechmann, M.Homberg, T.Grune, R.Hass, R.Nitsch. Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is linked to their activation state by poly(ADP-ribose) polymerase. *FASEB J.* 15, 1460-1462 (2001) online: 10.1096/fj.00-0540.fje (April 27, 2001c)

- O.Ullrich, T.Grune. Proteasomal degradation of oxidatively-damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 887-893 (2001d)
- O.Ullrich, A.Diestel, I.Y.Eyüpoglu, R.Nitsch. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Nature Cell Biol.* 3, 1035-1042 (2001e)

6. Danksagung

Erfolgreiche Forschung entsteht aus der engagierten, effektiven und fruchtbaren Zusammenarbeit vieler Menschen und ist vom Wesen her viel weniger eine Einzel- als eine Gemeinschaftsleistung. Daher möchte ich an allererster Stelle meinen Mitarbeitern danken: Ihre Begeisterung und ihr unermüdlicher Einsatz, ihre Liebe zum Detail und ihr Blick für das Ganze, und ihre Fähigkeit, die kleinen und größeren Probleme der experimentellen Forschung mit viel Humor und neuen Taten zu meistern, haben den wichtigsten und unverzichtbaren Grundstein dieser Arbeit gelegt: Für das Gelingen der in dieser Arbeit beschriebenen Projekte bin ich daher insbesondere der Biologin Antje Diestel, der Apothekerin Susi Keck und den Studentinnen der Medizin Özlem Ciftci und Astrid Selle zu großem Dank verpflichtet. Für die neu begonnenen Projekte danke ich in diesem Zusammenhang insbesondere den Studentinnen der Medizin Frau Claudia Kern und Frau Ines Häke, der medizinisch-technischen Assistentin Frau Anja Gräfe und der Diplomandin Frau Diana Poppek. Ihnen allen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Zu ebenso großen Dank bin ich aber vor allem auch Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch verpflichtet: In seiner Arbeitsgruppe traf ich auf eine Konzentration herausragender, hochgradig engagierter und begeisterter Wissenschaftler, von deren Expertise ich in besonderem Maße lernen konnte. Er selber war jederzeit ein hochgradig kompetenter, offener, und kritischer Ansprechpartner für alle Fragen der wissenschaftlichen Arbeit. Sein herausragender Einsatz für das Voranschreiten der wissenschaftlichen Arbeit und für seine Arbeitsgruppe ist einzigartig, und es war für einen jungen Wissenschaftler wie mich ein wirklicher Glücksfall, Mitglied seines Teams werden zu dürfen. Von seinen Mitarbeitern möchte ich insbesondere Herrn Dr. Olaf Ninnemann, Herrn PD Dr. Ingo Bechmann, Herrn PD Dr. Bernd Heimrich, Frau Dr. Ulrike Gimsa (jetzt Universität Rostock), Frau Dr. Susanne Wolf (jetzt NIH, Washington), Frau Dr. Martina Plaschke, Frau Lewandowski, Frau Wachenschwanz und Frau Mannsfeld sowie Frau Marni Pollrich und Frau Trina Irigo danken. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Ralf Hass (jetzt MH Hannover) bedanken, der in meinen ersten beiden Jahren am Institut für Anatomie ein ausgezeichnete wissenschaftlicher Mentor war.

Außerdem möchte ich mich besondere bei Herr Prof. Dr. Gottfried Bogusch bedanken. Ich hatte das Glück, meinen allerersten Präparierkurs unter seiner Leitung durchzuführen zu dürfen. Seine ausgewiesene Kompetenz und sein Erfahrungsschatz, sowie sein unverwechselbarer Stil waren für mich in der Lehre ein großes Vorbild.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben weiterhin beigetragen: Herr PD Dr. Tilman Grune (NWFZ, Charité), Herr Prof. Dr. Kelvin Davies (USC, Los Angeles), Herr Prof. Dr. Felix Althaus (Universität Zürich), Herr Prof. Dr. Myron Jacobson (University of Tucson), Herr Prof. Dr. Ulrich Dirnagl (Charité) und Herr Prof. Dr. Uwe Heinemann (Charité).

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie großer Dank, denn ohne ihre Unterstützung und vor allem ihr weitreichendes Verständnis wäre vieles nicht möglich gewesen. Ich danke meiner Frau Monika, meinem Sohn Max Ferdinand, meinen Eltern und Großeltern aus Berlin und meinen Schwiegereltern aus Friedrichshafen am Bodensee. Vor allem danke ich meinem verstorbenen Vater Bernd Ullrich, der sich sicher über diese Arbeit gefreut hätte.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

7.1.1 Allgemeines

Name: Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Ullrich

Geboren am: 9. Juli 1970 in Berlin

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

Beruf: Arzt und Biochemiker, Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Zell- und Neurobiologie des Instituts für Anatomie am Universitätsklinikum Charité

7.1.2 Schulbildung

1976 – 1980 Grundschule am Regenweiher, Berlin-Neukölln

1980 – 1989 Goethe-Gymnasium, Berlin-Wilmersdorf Allgemeine Hochschulreife mit Erwerb des Latinums und des Graecums (Durchschnittsnote: 1,5)

7.1.3 Universitäre Ausbildung

1989 - 1996 Studium der **Humanmedizin** an der Freien Universität Berlin Datum des 3.Abschnitts der Ärztlichen Prüfung: 09.05.1996
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: **gut (2,1)**

1990 – 1994 Studium der **Biochemie** an der Freien Universität Berlin, Schwerpunktfächer Biochemie, Organische Chemie und Klinische Chemie,
Datum des Diploms: 14.08.1994
Gesamtnote der Diplomprüfung: **sehr gut**

7.1.4 Diplomarbeit/Dissertationen

- Diplomarbeit:** Wechselwirkungen des zytotoxischen Lipidperoxydationsproduktes 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal mit Mitochondrien: Mitochondrialer Metabolismus und Beeinflussung mitochondrialer Funktionskriterien (*Betreuung: Prof. Dr. E. Riedel, Priv.-Doz. Dr. W. Siems, Fachbereich Chemie der FU Berlin und Institut für Biochemie der HU Berlin, 1994, Note: **sehr gut***)
- Dissertation (Dr.med.):** Metabolische Wirkung des Lipidperoxydationsproduktes 4-Hydroxynonenal auf die Poly-ADP-Ribosylierung in primären Synovialfibroblasten. (*Betreuung: Prof. Dr. E. Conradi, Universitätsklinikum Charité der HU Berlin und Dr. W. Ehrlich, Robert-Koch-Institut, 1998, Prädikat: **summa cum laude***)
- Dissertation (Dr.rer.nat.):** Funktion und Regulation des nukleären 20S Proteasoms beim Abbau oxidativ geschädigter Histone in humanen K562 Zellen (*Betreuung: Prof. Dr. E. Riedel, Freie Universität Berlin und Priv.-Doz. Dr. T. Grune, Universitätsklinikum Charité der HU Berlin, 1998, Prädikat: **magna cum laude***)

7.1.5 Berufliche Tätigkeiten

- November 1996 – April 1998 Stipendiat (Doctoral Fellowship) der Ernst-Schering-Research-Foundation und Arzt im Praktikum im Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität Berlin
- 03.04.1998 Approbation als Arzt
- Mai 1998 - September 1998 Forschungsstipendiat der Charité
- Seit Oktober 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Zell- und Neurobiologie (Prof. Dr. Robert Nitsch) am Institut für Anatomie der Charité
- Seit August 2000 Arbeitsgruppenleiter

7.2 Publikationsverzeichnis

7.2.1. Originalarbeiten

1. **O.Ullrich**, T.Grune, W.Henke, H.Esterbauer, W.G.Siems. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* 352, 84-86 (1994)
IF = 3,581
2. **O.Ullrich**, T.Grune, W.Henke, H.Esterbauer, W.G.Siems. The effect of the cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and its metabolite 4-hydroxynonenic acid on respiration of isolated rat kidney cortex mitochondria. *Free Radical Res.* 24(6), 421-427 (1996) *IF* = 2,034
3. **O.Ullrich**, T.Grune, K.Lehmann, H.Huser, W.Ehrlich, W.G.Siems. Inhibition of the poly(ADP-ribose) formation by 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 315(3), 705-708 (1996) *IF* = 3,855
4. **O.Ullrich**, H.Huser, W.Ehrlich, T.Grune. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Free Radical Biol. Med.* 22(7), 1153-1157 (1997) *IF* = 4,348
5. **O.Ullrich**, T.Grune. Detection of 8-hydroxy-deoxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high performance capillary electrophoresis. *J. Chrom. B* 697, 243-249 (1997) *IF* = 1,395
6. O.Sommerburg, **O.Ullrich**, N.Sitte, W.Siems, T.Grune. Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light - Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 24(9), 1369-1374 (1998) *IF* = 4,348
7. T.Reinheckel, N.Sitte, **O.Ullrich**, U.Kuckelkorn, K.J.A.Davies, T.Grune. Resistance of the 20S proteasome to oxidative stress - comparison of the activities of the 20S and 26S proteasome. *Biochem. J.* 335, 637-642 (1998) *IF* = 3,855
8. **O.Ullrich**, N.Sitte, O.Sommerburg, V.Sandig, T.Grune. Influence of DNA binding on the degradation of oxidized histones by the 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 362(2), 21-216 (1999) *IF* = 2,497

9. **O.Ullrich**, T.Reinheckel, N.Sitte, R.Hass, T.Grune. Poly-ADP-ribose-polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6223-6228 (1999) IF = 9,821
10. P. Meyer-Kuckuk, **O.Ullrich**, T.Grune, M. Ziegler, M.Schweiger. Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 259, 576-581 (1999) IF = 2,780
11. **O.Ullrich**, T.Reinheckel, N.Sitte, T.Grune. Degradation of hypochlorite damaged glucose-6-phosphate dehydrogenase by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 27, 487-492 (1999) IF = 4,348
12. T.Reinheckel, **O.Ullrich**, N.Sitte, T.Grune. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 377(1), 65-68, (2000) IF = 2,497
13. **O.Ullrich***, Ö.Ciftci*, R.Hass. Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase in human myelomonocytic cells after oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 29(10), 995-1004 (2000) *both authors contributed equally as "first author" IF = 4,348
14. J.Mehlhase, J.Gieche, **O.Ullrich**, N.Sitte, T.Grune. LPS-induced protein oxidation and proteolysis in BV-2 microglial cells. *IUBMB Life* 50(4-5), 331-335 (2000) IF = 0,418
15. P.Lasch, T.Petras, **O.Ullrich**, J.Backmann, D.Naumann, T.Grune. Hydrogen peroxide- induced structural alterations of RNase A *J. Biol. Chem.* 276, 9492-9502 (2001) IF = 7,199
16. Ö.Ciftci*, **O.Ullrich***, C.A.Schmidt, A.Diestel, R.Hass. Regulation of the nuclear proteasome activity in human leukemia cells after adriamycin-treatment. *Blood* 97(9), 2830-2838 (2001) *both authors contributed equally as "first author" IF = 8,372
17. **O.Ullrich**, A.Diestel, I.Bechmann, M.Homberg, T.Grune, R.Hass, R.Nitsch. Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is linked to their activation state by poly(ADP-ribose) polymerase. *FASEB J.* 15, 1460-1462 (2001) online: 10.1096/fj.00-0540.fje (April 27, 2001) IF = 13,861
18. **O.Ullrich**, T.Grune. Proteasomal degradation of oxidatively-damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 887-893 (2001) IF = 4,348

19. **O.Ullrich***, A.Diestel*, I.Y.Eyüpoglu, R.Nitsch. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Nature Cell Biol.* 3, 1035-1042 (2001) *both authors contributed equally as "first author" IF = 11,939
20. S.Keck, R.Nitsch, T.Grune, **O.Ullrich**. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau (PHF-tau) in the brain of patients with Alzheimers disease. (submitted)

Summe der Impact-Faktoren aller bereits publizierten oder „in press“ befindlichen Publikationen = 95,844

Summe der Impact-Faktoren aller Erstautorpublikationen = 74,747

7.2.2 Übersichtsartikel

1. **O.Ullrich**, T.Grune. Freie Radikale: Angriff auf Neurone (Review und Titelthema). *Pharmazeutische Zeitschrift* 46 (2001)
2. **O.Ullrich**, T.Grune. Oxidative Schäden bei neurodegenerativen Erkrankungen (Review und Titelthema). *Pharmazeutische Zeitschrift* 47 (2001)

7.2.3 Eingeladene Hauptvorträge auf internationalen Konferenzen

O.Ullrich. A new mechanism to protect neurons from secondary damage by microglial PARP-1 inhibition. *13th International Conference on ADP-Ribosylation reactions, New York, USA (2001), invited plenary lecture*

7.2.4 Vorträge

1. **O.Ullrich**. Poly-ADP-Ribosylierung: Relevanz von 4-Hydroxynonenal bei Genexpression und DNA-Reparatur. 11.Meeting des Sauerstoffclubs Berlin und Brandenburg, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke, 13.07.1995
2. **O.Ullrich**. Biologische Effekte des Lipidperoxidaionsproduktes 4-Hydroxynonenal: Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette und die nukleäre Poly-ADP-Ribose-Synthese. Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Magdeburg, 20.02.1997
3. **O.Ullrich**. Aktivierung des nukleären 20S-Proteasoms durch Poly-ADP-Ribosylierung nach oxidativen Stress - Bedeutung für den selektiven Abbau

oxidativ geschädigter Histone ? Meeting des Sauerstoffclubs Berlin und Brandenburg, Universitätsklinikum Charité, Berlin, Januar 1998

4. **O.Ullrich.** Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-gesteuerte Aktivierung des nukleären Proteasoms nach oxidativen Stress in hochmalignen humanen Leukämiezellen. 16. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, Germany (1999)
5. P.Mayer-Kuckuk, **O.Ullrich.** Poly(ADP-ribosyl)transferase and nuclear proteolysis. Institut für Veterinärpharmakologie, Universität Zürich (1999)
6. **O.Ullrich.** Functional involvement of poly-ADP-ribose-polymerase in activation, migration and survival of microglial cells. 7.Tagung "Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung", Weinheim, Germany (2000)
7. W.Siems, **O.Ullrich,** T.Grune. Apoptose, Proteinoxidation und Proteinturnover in PC12-Zellen. 7.Tagung "Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung", Weinheim, Germany (2000)
8. S.Keck, T.Grune, **O.Ullrich.** Protein turnover and oxidative stress – applications to the tau protein. 1st Meeting "Cellular Mechanisms of Alzheimers disease.", Eibsee, Germany (2000)
9. **O.Ullrich.** Prevention of secondary neuronal damage by targeting microglial PARP-dependent signaling. 96.Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Münster, Germany (2001)
10. Ö.Ciftci, **O.Ullrich,** C.A.Schmidt, A.Diestel, R.Hass PARP-associated proteasome activation represents a possible target within chemotherapeutic defense mechanisms developed by leukemia cells. 13th International Conference on ADP-Ribosylation reactions, New York, USA (2001),

7.2.5 Beiträge auf internationalen und nationalen Konferenzen (Abstracts)

1. **O.Ullrich**, T.Grune, W.Henke, K.Jung, W.G.Siems. The effect of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on respiratory parameters of isolated rat kidney cortex mitochondria. *Critical Aspects of Free radicals in Chemistry, Biochemistry and Medicine, Vienna, Austria, 1993*
2. **O.Ullrich**, K.Lehmann, T.Grune, W.G.Siems, H.Huser, H.Kröger, W.Ehrlich. Inhibition of the poly(ADP-ribosyl)ation by physiological concentrations of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rabbit synovial fibroblasts. *Cellular Oxidants Conference, Queenstown, New Zealand, 1994*
3. **O.Ullrich**, T.Grune, W.G.Siems. Metabolism of 4-hydroxynonenal in mitochondria. *7th Biennial Scientific Meeting of the International Society for Free Radical Research, Sydney, Australia, 1994*
4. **O.Ullrich**, W.G.Siems, K.Lehmann, H.Huser, W.Ehrlich, T.Grune. Interactions of 4-hydroxynonenal and poly-ADP-ribose in a cell model of rheumatoid arthritis. *8th Biennial Scientific Meeting of the International Society for Free Radical Research, Barcelona, Spain (1996)*
5. **O.Ullrich**, T.Grune. Activation of the 20S proteasome by poly-ADP-ribosylation and free ADP-ribose in isolated nuclei of K562 human hematopoietic cells. *International Symposium on Free Radicals in Medicine and Biology, Udaipur, India (1997)*
6. **O.Ullrich**, N.Sitte, T.Grune. Detachment of histones from DNA and increased proteolytic susceptibility by the 20S proteasome after oxidative stress. *International Symposium on Free Radicals in Medicine and Biology, Udaipur, India (1997)*
7. **O.Ullrich**, T.Grune. Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high performance capillary electrophoresis. *International Symposium on Free Radicals in Medicine and Biology, Udaipur, India (1997)*
8. T. Grune, N.Sitte, **O.Ullrich**. Stability of histones after oxidative stress. *Gorden Research Conference "Oxygen Radicals in Biology", Ventura, California, USA (1998)*
9. T.Grune, N.Sitte, **O.Ullrich**. Poly-ADP-ribose mediated regulation of the 20S proteasome. *Annual Meeting of the Oxygen Club of California - '98 World*

Congress "Oxidants and Antioxidants in Biology", Santa Barbara, California, USA (1998)

10. **O.Ullrich**, T.Grune. Poly(ADP-ribosyl)ation-regulated degradation of histones by the 20S proteasome after oxidative stress. *Autumn Meeting of the Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Jena, Germany (1998)*
11. **O.Ullrich**, T.Grune. Proteasomal histone degradation in K562 cells after oxidative stress. *5th Annual Meeting of the Oxygen Society, Washington D.C., USA (1998)*
12. **O.Ullrich**, N.Sitte, T.Grune. Inhibition of the 20S proteasome by DNA-histone-crosslinks. *5th Annual Meeting of the Oxygen Society, Washington D.C., USA (1998)*
13. P.Meyer-Kuckuk, **O.Ullrich**, T.Grune, M.Schweiger. Poly(ADP-ribosyl)transferase interacts with the 20S proteasome complex in vitro. *5th Annual Meeting of the Oxygen Society, Washington D.C., USA (1998)*
14. K.Krämer, P.P.Hoppe, U.Oberfrank, T.Grune, **O.Ullrich**, N.Sitte, W.G.Siems. Balance between (n-3) PUFA and vitamine E in eggs. *Annual Meeting of the Oxygen Club of California - '98 World Congress, Santa Barbara, California, USA (1999)*
15. **O.Ullrich**, I.Bechmann, B.Steiner, M.Homberg, R.Hass, R.Nitsch. Enhanced degradation of oxidatively modified proteins by activated microglia in a proteasome- and PARP-dependent pathway. *Berlin Neuroscience Forum, Bogensee, Germany (1999)*
16. M.Schrimpf, **O.Ullrich**, H.Ott. Effect of a 40 hour-sleep deprivation on the EEG and performance during a vigilance task. *Berlin Neuroscience Forum, Bogensee, Germany (1999)*
17. R.Hass, **O.Ullrich**, D. Bächner. Astrocytes induce differentiation and GFAP expression in human promonocytic cells. *Berlin Neuroscience Forum, Bogensee, Germany (1999)*
18. **O.Ullrich**, M.Homberg, I.Bechmann, B.Steiner, R.Nitsch. Antioxidativer Schutz aktivierter BV-2 Mikrogliazellen aufgrund des proteasomalen Abbaus oxidierter Proteine. *16. Arbeitstagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, Germany (1999)*

19. Ö.Ciftci, **O.Ullrich**, R.Hass. High malignancy in human leukemic cells is associated with increased proteasome activity after oxidative stress and requires PARP. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Jena, Germany (1999)*
20. **O.Ullrich**, I.Bechmann, B.Steiner, M.Homberg, R.Hass, R.Nitsch. Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is proteasome-dependent and linked to its activation state by poly(ADP-ribose)polymerase. *29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami, USA (1999)*
21. A.Selle, **O.Ullrich**, R.Hass. Functional active poly(ADP-ribosyl)transferase upregulates nuclear protein turnover during retrodifferentiation of human U937 myelomonocytic leukemia cells. *3th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Berlin, Germany (1999)*
22. Ö.Ciftci, **O.Ullrich**, R.Hass. Regulation of protein degradation after oxidative stress in different states of malignancy of human U937 myelomonocytic leukemia cells. *3th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Berlin, Germany (1999)*
23. **O.Ullrich**, P.Mayer-Kuckuk, T.Grune, R.Hass. Regulation of the nuclear 20S proteasome after oxidative stress. *3rd Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Berlin, Germany (1999)*
24. **O.Ullrich**, A.Diestel, I.Eyüpoglu, R.Nitsch. Microglia activation and migration towards sites of excitotoxic neuronal injury requires functional active poly-ADP-ribose polymerase. *Anatomy 2000 Tripartite Meeting, Cambridge, UK (2000)*
25. **O.Ullrich**, A.Diestel, I.Eyüpoglu, R.Nitsch. Functional involvement of poly-ADP-ribose-polymerase in microglia activation, antioxidative defence and migration towards sites of excitotoxic neuronal injury. *17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Berlin, Germany (2000)*
26. **O.Ullrich**, A.Diestel, R.Nitsch and F.Zipp. Microglia activation by cholesterol oxides in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)*
27. A.Diestel, I.Eyüpoglu, R.Nitsch, **O.Ullrich**. Functional involvement and signalling of poly-ADP-ribose-polymerase in microglia activation and

- migration towards sites of excitotoxic neuronal injury. *30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)*
28. Ö.Ciftci, **O.Ullrich**, R.Hass. PARP-dependent proteasome activation in human leukemic cells after adriamycin treatment. *4th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Berlin, Germany (2000)*
 29. E.Kwidzinski, S.Peter, **O.Ullrich**, U.Gimsa, F.Zipp, R.Nitsch, I.Bechmann. Expression und Regulation der IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) im ZNS. *96.Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Münster, Germany (2001)*
 30. Ö.Ciftci, **O.Ullrich**, R.Hass. Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase is involved in potential protection mechanisms in oxidatively-stressed human myelomonocytic cells. *13th International Conference on ADP-Ribosylation reactions, New York, USA (2001)*
 31. S.Keck, R.Nitsch, T.Grune, **O.Ullrich**. Proteasome inhibition by paired helical filaments (PHFs) in brains of patients with Alzheimer's disease. *18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Buenos Aires, Argentina (2001)*
 32. A.Diestel, R.Nitsch, **O.Ullrich**. Prevention of secondary neuronal damage by microglial PARP-1 inhibition. *31th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA (2001)*
 33. S.Keck, R.Nitsch, T.Grune, **O.Ullrich**. Paired helical filaments (PHFs) interact with the proteasome in brains of patients with Alzheimer's disease. *31th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA (2001)*
 34. **O.Ullrich**, A.Diestel, R.Nitsch. Cholesteroxid-vermittelte Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen durch exzitotoxisch geschädigte Neurone. *18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany (2001)*
 35. Ö.Ciftci, A.Diestel, C.A.Schmidt, R.Hass, **O.Ullrich**. PARP-vermittelte Proteasomaktivierung bei Chemotherapie-assoziierten Resistenzmechanismen in Leukämiezellen. *18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany (2001)*
 36. A.Diestel, I.Häke, O.Aktas, R.Nitsch, F.Zipp, **O.Ullrich**. Mikroglia-Aktivierung durch oxidierte Cholesterole im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Multipler Sklerose. *18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany (2001)*

37. S.Keck, R.Nitsch, T.Grune, **O.Ullrich**. Proteasom-Hemmung durch PHFs im Hirn von Patienten mit Alzheimer-Erkrankung. *18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany (2001)*
38. A.Selle, **O.Ullrich**, R.Hass. Retrodifferentiation of human leukemic cells is mediated by poly-ADP-ribose-polymerase. *5th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Weimar, Germany (2001)*
39. **O.Ullrich**, A.Diestel, I.Eyüpoglu, R.Nitsch. Neuroprotection by downregulation of microglial PARP-1 and CD11a expression. *5th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Weimar, Germany (2001)*
40. **O.Ullrich**, A.Diestel, I.Eyüpoglu, R.Nitsch. A new mechanism to protect neurons from secondary damage by microglial PARP-1 inhibition. *Ernst-Schering-Research-Foundation-Workshop, Berlin, Germany (2001)*

7.3 Stipendien und Preise

Fellowship of the Ernst-Schering-Research Foundation

Ernst-Schering-Research-Foundation, 1996

First Prize (Young Investigator Award)

International Symposium on Free Radicals in Medicine and Biology, India, 1997

Karl-Asmund-Rudolphi-Preis

Humboldt-Universität Berlin, 2000

Karl-Asmund-Rudolphi-Preis

Humboldt-Universität Berlin, 2001

Wolfgang-Bargmann-Preis

Anatomische Gesellschaft, 2002

7.4 Lehre

7.4.1 Lehrerfahrung

WS 1998/1999	Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs) Kursus der Neuroanatomie (Hirnkurs)
SS 1999	Kursus der mikroskopischen Anatomie Seminar „Anatomie mit klinischen Bezügen“
WS 1999/2000	Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs) Kursus der Neuroanatomie (Hirnkurs) Teile der Hauptvorlesung Anatomie I Neuroanatomie für Neurologen, Neurochirurgen und Psychiater
SS 2000	Kursus der mikroskopischen Anatomie Seminar „Anatomie mit klinischen Bezügen“
WS 2000/2001	Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs) Kursus der Neuroanatomie (Hirnkurs) Neuroanatomie für Neurologen, Neurochirurgen und Psychiater
SS 2001	Kursus der mikroskopischen Anatomie Seminar „Anatomie mit klinischen Bezügen“
WS 2001/2002	Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

7.4.2 Persönliche Ergebnisse innerhalb der Lehrevaluation der Charité

Wintersemester 2000/2001

Kursus der Makroskopischen Anatomie	<i>Durchschnittsnote: 1,08</i> 535 Einzelbewertungen
Kursus Neuroanatomie	<i>Durchschnittsnote: 1,15</i> 240 Einzelbewertungen
<i>Ranking innerhalb des Instituts für Anatomie</i>	Platz 1
<i>Ranking innerhalb aller Dozierender der Vorklinik</i>	Platz 1
<i>Karl-Asmund-Rudolphi-Preis für die beste vorklinische Lehre</i>	

Sommersemester 2000

Kursus der Mikroskopischen Anatomie	Durchschnittsnote: 1,55 526 Einzelbewertungen
Seminar „Anatomie mit klinischen Bezügen“	Durchschnittsnote: 1,52 124 Einzelbewertungen
<i>Ranking innerhalb des Instituts für Anatomie</i>	Platz 1 (von 24 Dozierenden)

Wintersemester 1999/2000

Kursus der Makroskopischen Anatomie	Durchschnittsnote: 1,07 546 Einzelbewertungen
Kursus Neuroanatomie	Durchschnittsnote: 1,36 319 Einzelbewertungen
<i>Ranking innerhalb des Instituts für Anatomie</i>	Platz 1 (von 24 Dozierenden)
<i>Ranking innerhalb aller Dozierender der Vorklinik</i>	Platz 1
<i>Karl-Asmund-Rudolphi-Preis für die beste vorklinische Lehre</i>	

Sommersemester 1999

Kursus der Mikroskopischen Anatomie

Durchschnittsnote: **1,77**

35 Einzelbewertungen

Seminar „Anatomie mit klinischen Bezügen“

keine Evaluierung

Keine Evaluierung, da zu wenig Einzelbewertungen

Ranking innerhalb des Instituts für Anatomie

Platz 2

(von 26 Dozierenden)

Wintersemester 1998/1999

Kursus der Makroskopischen Anatomie

Durchschnittsnote: **1,60**

485 Einzelbewertungen

Kursus Neuroanatomie

Durchschnittsnote: **1,22**

102 Einzelbewertungen

Ranking innerhalb des Instituts für Anatomie

Platz 2

(von 25 Dozierenden)

7.5 Drittmittel

1996 – 1998 Fellowship of the *Ernst-Schering-Research Foundation*

2000 – 2002 DFG-Schwerpunkt "Zelluläre Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung" mit dem Projekt "Turnover and posttranslational modification of tau in hippocampal neurons during oxidative stress" (UL 177/2-1)

Seit 2002 SFB 507 (Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen), Teilprojekt C6 „Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide“

7.6 Wissenschaftlicher Werdegang

- 1989 – 1996 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- 1990 – 1994 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
- 1991 – 1993 Wissenschaftliche Ausbildung in den Arbeitsgruppen:
Priv.-Doz. Dr.med. W. Siems, Institut für Biochemie der Charité
Dr. W. Henke, Abt. für experimentelle Organtransplantation der Charité, Krankenhaus Friedrichshain
Prof. Dr. E. Riedel, Institut für Biochemie der FU Berlin
- 1994 Diplomarbeit im Fach Biochemie mit dem Titel „Wechselwirkungen des zytotoxischen Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal mit Mitochondrien: Mitochondrialer Metabolismus und Beeinflussung mitochondrialer Funktionskriterien“
Betreuer:
Prof. Dr. E. Riedel, Institut für Biochemie
Priv.-Doz. Dr.med. W. Siems, Institut für Biochemie der Charité
Note: sehr gut
- 1994 – 1996 Anfertigung der Dissertation zum Dr.med. in den Arbeitsgruppen:
Prof. Dr. Dr. H. Kröger, Robert-Koch-Institut Berlin
Dr. W. Ehrlich, Robert-Koch-Institut Berlin
Prof. Dr. E. Conradi, Klinik für Physikalische Medizin der Charité
Thema: „Metabolische Wirkung des Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal auf die Poly-ADP-Ribosylierung in primären Synovialfibroblasten.“
Jahr der Promotion: 1998
Prädikat: summa cum laude

- 1996 – 1998 Fellow der Ernst-Schering-Research-Foundation
 Anfertigung der Dissertation zum Dr.rer.nat. in den Arbeitsgruppen:
Prof. Dr. E. Riedel, Institut für Biochemie der FU Berlin
Prof. Dr. Dr. M. Schweiger, Institut für Biochemie der FU Berlin
Priv.-Doz. Dr. T. Grune, Klinik für Physikalische Medizin der Charité
Internationale Kooperation: Prof. K. Davies, USC, Los Angeles, USA
 Thema: „Funktion und Regulation des nukleären 20S Proteasoms beim
 Abbau oxidativ geschädigter Histone in humanen K562 Zellen“
 Jahr der Promotion: 1998
 Prädikat: magna cum laude
- Seit 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Zell- und Neurobiologie des
 Instituts für Anatomie der Charité (*Prof. Dr. R. Nitsch*)
- 1998 – 1999 Postdoc in der Arbeitsgruppe von *Priv.-Doz. Dr. rer. nat. R.Hass*
- Seit 2000 Arbeitsgruppenleiter in der Abteilung von *Prof. Dr. R. Nitsch*

7.7 Eidesstattliche Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich